

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

DIMETHYLPHOSPHAT
UND DIMETHYLTHIOPHOSPHAT –
GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG
UND NACHWEIS IM URIN BEI
ALKYLPHOSPHATVERGIFTUNGEN

Inaugural -Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Heinrich Hindelang
aus Neumarkt

1983

1983 № 256





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546202_0054

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**DIMETHYLPHOSPHAT
UND DIMETHYLTHIOPHOSPHAT –
GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG
UND NACHWEIS IM URIN BEI
ALKYLPHOSPHATVERGIFTUNGEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Heinrich Hindelang
aus Neumarkt

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.1983

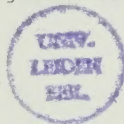
Häufig verwendete Abkürzungen:

DMP	Dimethylphosphorsäure	oder Dimethylphosphat
DMTP	Dimethylthiophosphorsäure	" Dimethylthiophosphat
DMDTP	Dimethyldithiophosphorsäure	" Dimethyldithiophosphat
DEP	Diethylphosphorsäure	" Diethylphosphat
DETP	Diethylthiophosphorsäure	" Diethylthiophosphat
DEDTP	Diethyldithiophosphorsäure	" Diethyldithiophosphat
TMP	Trimethylphosphorsäure	" Trimethylphosphat
TEP	Triethylphosphorsäure	" Triethylphosphat
mDMP	methyliertes Dimethylphosphat	
eDMP	ethyliertes Dimethylphosphat	
mDMTP	methyliertes Dimethylthiophosphat	
eDMTP	ethyliertes Dimethylthiophosphat	
mDEP	methyliertes Diethylphosphat	
eDEP	ethyliertes Diethylphosphat	
mDETP	methyliertes Diethylthiophosphat	
eDETP	ethyliertes Diethylthiophosphat	

In der vorliegenden Arbeit sind die Bezeichnungen, die zugleich eingetragene Warenzeichen sind, in der Regel als solche nicht besonders kenntlich gemacht. Es kann also aus der Bezeichnung der Ware mit dem für diese eingetragenen Warenzeichen nicht geschlossen werden, daß die Bezeichnung ein freier Warenname ist.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A	EINLEITUNG 1
1.	<u>Über die Anwendung von Phosphorsäure-</u> <u>estern, speziell von Pflanzenschutz-</u> <u>mitteln auf Alkylphosphatbasis; An-</u> <u>merkung zur Toxizität der Alkylphosphate</u> 1
2.	<u>Übersicht über die klinische Toxikologie</u> <u>von Alkylphosphatvergiftungen</u> 2
2.1.	Statistische Grundlagen 2
2.2.	Toxikologische Nachweismöglichkeiten 3
3.	<u>Auflistung der erfaßten Insektizide,</u> <u>die Derivate der Dimethyl-, Dimethylthio-</u> <u>und Dimethyldithiophosphorsäure sind</u> 4
B	ÜBERBLICK ÜBER BISHER VORLIEGENDE VER- ÖFFENTLICHUNGEN ZUM NACHWEIS VON DIMETHYL- PHOSPHAT UND DIMETHYLTHIOPHOSPHAT 18
C	PROBLEMSTELLUNG 24
D	ENTWICKLUNG EINER GASCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEISMETHODE FÜR DIMETHYLPHOSPHAT UND DIMETHYLTHIOPHOSPHAT 27
1.	<u>Gaschromatographische Trennung von Dimethyl-</u> <u>phosphat und Dimethylthiophosphat</u> 27
1.1.	Derivatisierung für die Gaschromatographie 27
1.1.1.	Allgemeine Gesichtspunkte zur Derivati- sierung mittels Alkylierung 27
1.1.2.	Herstellung der Alkylierungsmittel 32
1.1.2.1.	Theoretische Grundlagen 32
1.1.2.2.	Arbeitsvorschrift für die Herstellung eines Alkylierungsmittels 33



1.1.3.	Alkylierungsreaktion	34
1.1.4.	Ausschluß von Störungen der gas- chromatographischen Messung durch die Alkylierungsmittel	36
1.1.5.	Ausbeuten bei der Derivatisierung	36
1.2.	Gaschromatographische Trennung	37
1.2.1.	Gerätedaten und Detektortyp	37
1.2.2.	Auswahl der Trennsäulen	40
1.2.3.	Gaschromatographische Messung der derivatisierten Untersuchungsan- sätze	43
1.2.3.1.	Einspritztechnik	43
1.2.3.2.	Vergleichsstandards	44
1.2.3.3.	Meßbereiche	44
1.2.3.4.	Auswertung der gaschromatographischen Meßergebnisse	45
2.	<u>Eichkurven</u>	47
2.1.	Eichkurven für methyliertes Dimethyl- phosphat (mDMP) bzw. Trimethylphosphat (TMP)	50
2.1.1.	Herstellung der Dimethylphosphat- Standardlösung	50
2.1.2.	Methylierung der Standardlösungen	51
2.1.3.	Herstellung der Trimethylphosphat- Standardlösung	52
2.1.4.	Vergleich von methyliertem DMP-Standard und TMP-Standard	53
2.1.5.	Ergebnisse der gaschromatographischen Messungen	54
2.1.6.	Linearität	63
2.1.7.	Nachweisgrenze	63
2.2.	Eichkurven für ethyliertes Dimethyl- phosphat (eDMP)	63
2.2.1.	Herstellung der DMP-Standardlösung	63

	Seite
2.2.2.	Ethylierung der Standardlösung 64
2.2.3.	Ergebnisse der gaschromatographischen Messung 65
2.2.4.	Linearität 71
2.2.5.	Nachweisgrenze 71
2.3.	Eichkurven für methyliertes Dimethyl- thiophosphat (mDMTP) 72
2.3.1.	Herstellung der Dimethylthiophosphat- Standardlösung 72
2.3.2.	Methylierung der Standardlösung 72
2.3.3.	Ergebnisse der gaschromatographischen Messung 73
2.3.4.	Linearität 78
2.3.5.	Nachweisgrenze 78
2.4.	Eichkurven für ethyliertes Dimethyl- thiophosphat (eDMTP) 79
2.4.1.	Herstellung der Dimethylthio-Standard- lösungen 79
2.4.2.	Ethylierung der Standardlösungen 79
2.4.3.	Ergebnisse der gaschromatographischen Messung 80
2.4.4.	Linearität 87
2.4.5.	Nachweisgrenze 87
3.	<u>Dünnschichtchromatographisches Kontroll- verfahren zum qualitativen Nachweis von Dimethylphosphat, Dimethylthiophosphat, Diethylphosphat und Diethylthiophosphat</u> 88
3.1.	Theoretische Grundlagen 88
3.2.	Auswahl und Anwendung eines dünn- schichtchromatographischen Nachweisverfahrens für Dialkyl(thio)phosphate 90
3.2.1.	Darstellung und Anwendung der ver- wendeten Sprühreagenzien 90
3.2.2.	Vorversuche zur Auswahl der DC-Platten und der Laufmittel 92

	Seite
3.2.3.	Anwendungsbeispiele 94
3.2.3.1.	Dünnschichtchromatographische Trennung der Alkyl(thio)phosphate 94
3.2.3.2.	Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Methylierung von DMP, DEP, DMTP, DETP 96
3.2.3.3.	Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Ethylierung von DMP, DEP, DMTP, DETP 107
3.2.4.	Zusammenfassung 113
4.	<u>Entwicklung eines Verfahrens für die Extraktion von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat aus wäßriger Lösung</u> 114
4.1.	Extraktionsmittel 114
4.2.	Anzahl der Extraktionsschritte 116
4.3.	Einengen des Extraktes 118
4.4.	Extraktionsausbeuten 120
5.	<u>Aufarbeitung von biologischem Untersuchungsmaterial</u> 123
5.1.	Extraktion von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat aus biologischem Material 123
5.1.1.	Anwendbarkeit des Extraktionsverfahrens für wäßrige Lösungen auf verschiedenartiges biologisches Material 123
5.1.2.	Extraktionsausbeuten 125
5.1.3.	Nachweisgrenzen bei der Analyse von biologischem Material 126
5.2.	Verseifung von nichtmetabolisierten Alkylphosphorsäureestern 128
5.2.1.	Methode 128
5.2.2.	Ausbeuten 129
6.	<u>Zusammenfassende Darstellung der Methode</u> 131
6.1.	Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial 132

6.1.1.	Verseifung	132
6.1.2.	Extraktion	133
6.1.3.	Methylierung und Ethylierung	134
6.2.	Gaschromatographische Messung der alkylierten Extrakte	136
6.3.	Modifikation als qualitative Schnell- methode bei Verdacht auf Vergiftung mit Phosphorsäureestern	140
6.4.	Zeitbedarf	141
7.	<u>Lagerversuche</u>	142
7.1.	Problematik der Lagerung von Proben	142
7.2.	Versuchsdurchführung	143
7.3.	Auswertung	144
7.3.1.	Lagerversuch "Harn 1"	145
7.3.2.	Lagerversuch "Harn 2"	149
7.4.	Ergebnis	152
E	ANWENDUNG DER METHODE ZUM GASCHROMATO- GRAPHISCHEN NACHWEIS UND DER TRENNUNG VON DMP UND DMTP AN KLINISCHEN FALL- BEISPIELEN	153
1.	<u>Anwendungsbeispiel:</u> <u>Suizidversuch mit Methyl-Parathion</u>	153
1.1.	Anamnese	153
1.2.	Verlauf	154
1.3.	Vorliegende laborchemische und toxiko- logische Befunde	155
1.3.1.	Verlauf der Serum-Cholinesterase- Aktivität	156
1.3.2.	p-Nitrophenol-Bestimmung im Urin	157
1.4.	Gaschromatographische Prüfung auf DMP und DMTP in Serum	158
1.4.1.	Auswahl der Probe	158
1.4.2.	Aufarbeitung der Probe	158

1.4.3.	Gaschromatographische Messung und Auswertung	159
1.5.	Ergebnis	165
2.	<u>Anwendungsbeispiel:</u> <u>Intoxikation mit Metasystox</u>	166
2.1.	Anamnese und Verlauf	166
2.2.	Gaschromatographische Untersuchung auf DMP und DMTP in Vollblut	167
2.2.1.	Aufarbeitung der Probe	167
2.2.2.	Gaschromatographische Messung und Auswertung	170
2.3.	Ergebnis	176
3.	<u>Anwendungsbeispiel:</u> <u>Intoxikation mit Metasystox</u>	178
3.1.	Anamnese und Verlauf	178
3.2.	Gaschromatographische Untersuchung der Proben auf DMP und DMTP	179
3.2.1.	Auswahl der Proben	179
3.2.2.	Aufarbeitung der Proben	180
3.2.3.	Gaschromatographische Messung und Auswertung	181
3.3.	Ergebnis	196
3.4.	Dünnschichtchromatographische Kontrollanalyse	197
3.4.1.	Durchführung und Auswertung	197
3.4.2.	Ergebnis	201
4.	<u>Diskussion der Ergebnisse in den Anwendungsbeispielen</u>	202
F	DISKUSSION	203
G	ZUSAMMENFASSUNG	205
H	BIBLIOGRAPHIE	206

A EINLEITUNG

1. Über die Anwendung von Phosphorsäureestern, speziell von Pflanzenschutzmitteln auf Alkylphosphatbasis; Anmerkung zur Toxizität der Alkylphosphate

Organische Phosphorverbindungen finden heute in Industrie und Technik mannigfache Anwendung. Phosphorsäureester werden als Weichmacher für Kunststoffe, als Texturierungshilfsmittel bei der Faserverarbeitung, als Flammfestausrüstung von Textilien, als Waschmittelbestandteil, als Insektizid-Vorprodukte und für viele weitere Anwendungsbereiche verwendet. Thiophosphorsäureester werden einerseits als Schädlingsbekämpfungsmittel verwendet, sind andererseits aber auch als Kraftstoff- bzw. Öladditive und Hydraulikflüssigkeiten von großer Bedeutung (Ullmann, 1979).

Entsprechend den stark unterschiedlichen Anwendungsgebieten für Phosphorsäureester gibt es keine einheitliche Statistik für ihre Verwendung. Die hier zusammengestellten Daten vermitteln jedoch einen Eindruck über die wirtschaftliche Bedeutung der Verbindungsklasse: "Der Weltmarkt an Pflanzenschutzmitteln hatte 1976 einen Umsatz von 15,7 Milliarden DM. Davon entfallen etwa ein Drittel auf die Insektizide und knapp 60 % der Insektizide basieren auf Phosphorsäureester entsprechend einem Umsatz von 2,8 Milliarden DM." (Ullmann, 1979).

Speziell aus der Gruppe der Alkylphosphate konnten sehr wirksame Insektizide gefunden werden, die heute auf der ganzen Welt eine ungeheure Verbreitung erlangt haben (Moeschlin, 1980). Leider zeigen diese Insektizide

unter bestimmten Bedingungen auch bei Mensch und Nutztier ausgeprägte Giftwirkung. Alle Alkylphosphate sind durch Blockierung des Enzyms Acetylcholinesterase und anderer Cholinesterasen schwere Gifte und führen hauptsächlich durch Anhäufung von Acetylcholin zu den typischen Vergiftungserscheinungen. Die tödliche orale Dosis für den Erwachsenen beträgt z.B. bei Parathion 300 - 500 mg an reinem Wirkstoff (Müller, 1975).

2. Übersicht über die klinische Toxikologie von Alkylphosphatvergiftungen

2.1. Statistische Grundlagen

Die Gesamtzahl exogener Intoxikationen in der BRD kann jährlich auf 160 000 - 200 000 geschätzt werden, dabei entfällt mehr als die Hälfte auf Kinder. Die Zahl der Todesfälle mit Giftaufnahme als Todesursache liegt in den letzten Jahren bei etwa 6000 jährlich (nach den Ergebnissen zahlreicher statistischer Erhebungen an bundesdeutschen Kliniken und den Todesursachen-Statistiken des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden, aus Geldmacher - von Mallinckrodt, 1981).

Als Ursachen für die Giftaufnahme kommen Unfälle, absichtliche Selbstvergiftung und vereinzelt auch Mordversuche in Frage. Dabei nehmen bei Erwachsenen Vergiftungen durch Pflanzenschutzmittel auf Alkylphosphatbasis nach den häufigsten Vergiftungsursachen Alkohol, chemischen Giftstoffen aus Industrie und Haushalt, Lebensmitteln einschließlich Pilzen und Drogen einen nicht zu unterschätzenden Platz ein (nach Angaben der Toxikologischen Abteilung der Städtischen Krankenhausanstalten Nürnberg von 1976, aus Geldmacher - von Mallinckrodt, 1981).

Die Häufigkeit der akzidentellen Vergiftungen hat vor allem in den ländlichen Gegenden zugenommen, aber auch bei der Verwendung von Alkylphosphaten als Suizidmittel kann eine Zunahme beobachtet werden (Moeschlin, 1980). Während man in den 60er Jahren von einer regelrechten "E 605 - Mode" bei Selbstmorden und Giftmorden sprechen konnte, die dann wieder abklang (Prokop und Göhler, 1976), hat sich heute das Spektrum verwendeter Insektizide wesentlich verbreitert. So wurden uns im Zeitraum von 6 Monaten z.B. allein von der II. Medizinischen Klinik rechts der Isar in München Asservate von fünf Fällen von akuten Metasystox-Vergiftungen, eine Bromophos-Vergiftung und eine Vergiftung mit einem nicht bekannten Alkylphosphat zur toxikologischen Untersuchung übersandt.

2.2. Toxikologische Nachweismöglichkeiten

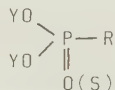
Für die toxikologische Untersuchung von Alkylphosphatvergiftungen mit einem nicht genau bekannten Insektizid besteht bisher die Möglichkeit, die Cholinesteraseaktivität im Serum zu bestimmen, die bei akuten Vergiftungen stark erniedrigt ist, während bei chronischen Vergiftungen die Messung der Erythrozytencholinesterase zuverlässiger ist (Moeschlin, 1980). Müller (1975) weist jedoch darauf hin, daß eine Deutung des gemessenen niedrigen Wertes u.U. dadurch erschwert wird, daß es Personen mit genetisch bedingt sehr niedriger Serum-Cholinesterase gibt und auch Carbamate und eine Reihe anderer Wirkstoffe das Enzym hemmen können.

Der gezielte Nachweis eines unbekannten Alkylphosphatesters kann entweder über ein Spaltprodukt des Esters (beim E 605: p-Nitrophenol) oder, wie meist, über das

unveränderte Molekül erfolgen. Zur Anwendung kommen hier z.B. Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), Spektrophotometrie oder Massenspektrometrie. Es existiert jedoch durch die großen Unterschiede in den Moleküleigenschaften dieser Verbindungen kein allgemeines Screeningverfahren, wie es beim Verdacht auf Alkylphosphatvergiftung notwendig wäre.

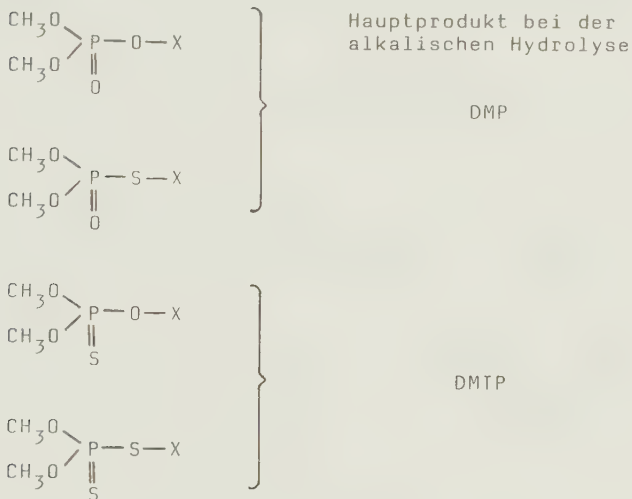
3. Auflistung der erfaßten Insektizide, die
Derivate der Dimethyl-, Dimethylthio- und
Dimethyldithiophosphorsäure sind

Nach Schrader (1963) haben alle wirksamen Alkylphosphate folgende chemische Struktur:



Dabei vertritt Y in der Regel Alkylreste, meist Methyl- oder Ethylgruppen, während der Rest R sehr variabel ist. Die meisten im Handel befindlichen Insektizide dieser Gruppe stellen Ester der Dimethylphosphorsäure (DMP), Diethylphosphorsäure (DEP), Dimethylthiophosphorsäure (DMTP), Diethylthiophosphorsäure (DETP), Dimethyldithiophosphorsäure (DMDTP) oder Diethyldithiophosphorsäure (DEDTP) dar.

Nach Askew et al. (1969) lassen sich folgende Typen von Insektiziden auf DMP oder DMTP zurückführen:

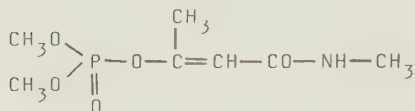


Die folgenden Listen (Liste 1, 2 und 3) nach Schrader (1963), Ullmann (1979) sowie Perkow (1979) enthalten eine Aufstellung der Insektizide und Akarizide, die diesem Strukturschema entsprechen und damit durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode theoretisch erfaßt werden können. Ähnliche Listen ließen sich für die Derivate der Diethylphosphor-, Diethylthiophosphor- und Dithiophosphorsäuren aufstellen. Alle Listen zusammen würden fast alle im Handel erhältlichen Insektizide, Nematizide und Akarizide auf Alkylphosphatbasis erfassen. Damit sind die theoretischen Grundlagen für ein ganz allgemein anwendbares Screeningverfahren gegeben.

Liste 1: Derivate der Dimethylphosphorsäure

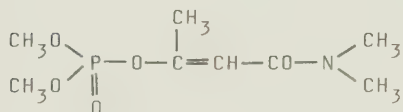
Azodrin (Nuvacron)

O,O-Dimethyl-2-methylcarbamyl-1-methyl-vinyl-phosphat



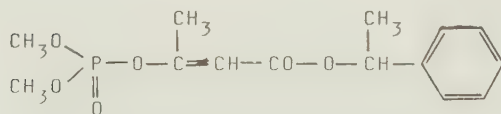
Bidrin (Bidrin, Carbicron, Ektafos)

O,O-Dimethyl-N-dimethyl-carbamyl-1-methyl-vinyl-phosphat



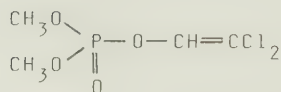
Ciodrin (nicht mehr im Handel)

-Methylbenzyl-3-(dimethoxyphosphinyloxy)-cis-crotonat



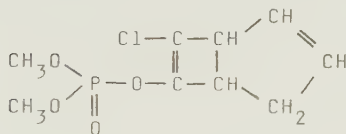
Dichlorvos (DDVP, Dede vap, Vapona u.a.)

O,O-Dimethyl-O-(2,2-dichlorvinyl)-phosphat



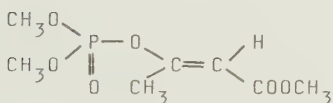
Heptenophos (Hostaquick)

O,O-Dimethyl-O-(7-chlor-bicyclo-hepta-2,6-dien-6-yl)-phosphat

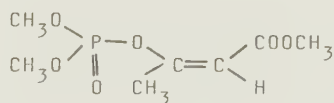


Mevinphos (Phosdrin, PD 5)

O-(2-Methoxycarbonyl-1-methyl-vinyl)-O,O-dimethyl-phosphat



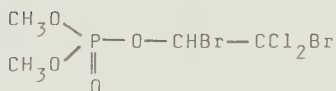
ca. 60 % (cis)



ca. 40 % (trans)

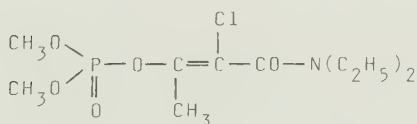
Naled (Dibrom)

O-(1,2-Dibrom-2,2-dichlor-ethyl)-O,O-dimethylphosphat



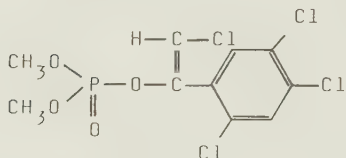
Phosphamidon (Dimecron)

O-(2-chlor-3-diethylamino-1-methyl-3-oxo-1-en-yl)-O,O-dimethyl-phosphat



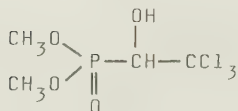
Tetrachlorvinphos (Gardona)

Beta-Isomere des 2-Chlor-1-(2,4,5-trichlor-phenyl)-vinyl-0,0-dimethylphosphats



Trichlorphon (Dipterex, Nerugon, Tugon, Dylox)

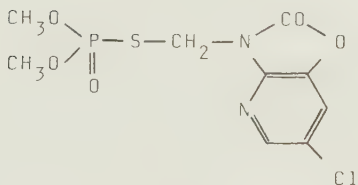
0,0-Dimethyl-2,2,2-trichlor-1-hydroxy-ethanphosphonat



Liste 2: Derivate der Dimethylthiophosphorsäure

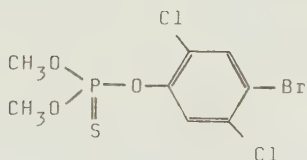
Azamethiphos (Alfacron)

O,O-Dimethyl-S- C-6-chlor-oxazolo 4,5-6 pyridin-
2(3H)-on3-yl)-methyl -thiophosphat



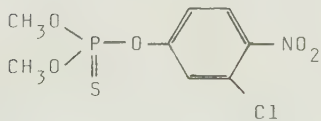
Bromophos (Nexion u.a.)

O-(4-Brom-2,5-dichlor-phenyl)-O,O-dimethyl-mono-
thiophosphat



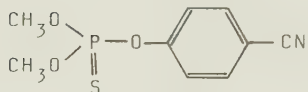
Chlorthion (nicht mehr im Handel)

O,O-Dimethyl-O-(3-chlor-4-nitrophenyl)-monothio-
phosphat



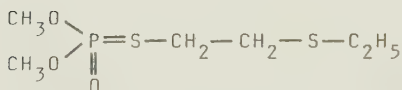
Cyanophos (Cyanox, Rockbal)

O,O-Dimethyl-O-(4-cyano-phenyl)-monothiophosphat



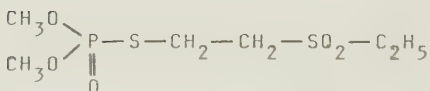
Demeton-S-methyl (Metasystox (i))

O,O-Dimethyl-S-(3-thio-pentyl)-monothiophosphat



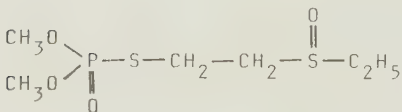
Demeton-S-methylsulfon

O,O-Dimethyl-S- 3-thio(dioxo)-pentyl -monothio-
phosphat



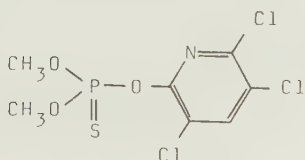
Demeton-S-methyl-sulfoxid (Metasystox R)

O,O-Dimethyl-S-(3-oxo-3-thio-pentyl)-monothio-
phosphat



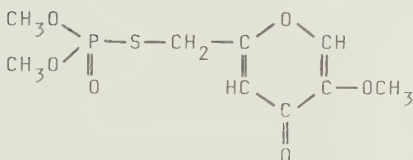
Dowco 214 (Reldan)

O,O-Dimethyl-O-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-thio-
phosphat



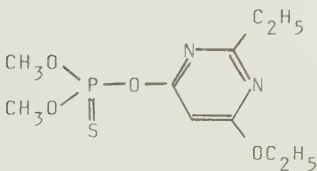
Endothion (Endocide R)

S- (5-Methoxy-4H-pyron-2-yl)-methyl -O,O-dimethyl-
monothiophosphat



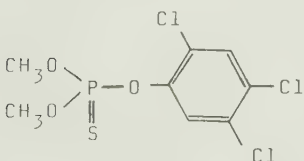
Etrinphos (Ekamet)

O, -(6-Ethoxy-2-ethyl-4-pyrimidinyl)-O,O-dimethyl-
thiophosphat



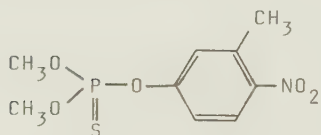
Fenchlorphos (Irolene, Korlan, Ronnel)

O,O-Dimethyl-O-2,4,5-trichlorphenyl-monothiophosphat



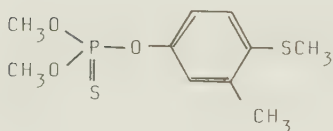
Fenitrothion (Folithion, Sumithion, Metathion)

O,O-Dimethyl-O-(3-methyl-4-nitro-phenyl)-mono-
thiophosphat



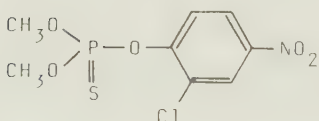
Fenthion (Mercaptophos, Baytex, Lebaycid)

O,O-Dimethyl-(3-methyl-4-methylthiophenyl)-
monothiophosphat



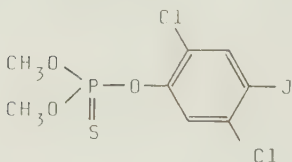
Isochlorthion (Dicapthon, ACC 4124)

O,O-Dimethyl-O-(2-chlor-4-nitrophenyl)-thiono-
phosphat



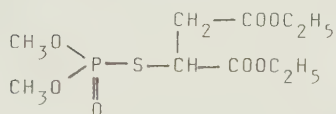
Jodfenphos (Nuvan)

O,O-Dimethyl-O-(2,5-dichlor-4-jodphenyl)-mono-
thiophosphat



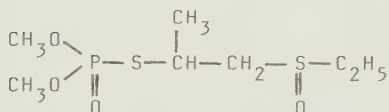
Malaaxon

O,O-Dimethyl-S(1,2-dicarbethoxy-ethyl)-thiophosphat



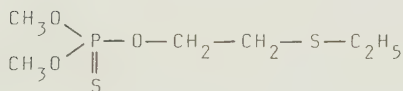
Metasystox S

O,O-Dimethyl-S-2-(ethylsulfinyl)-isopropylthiophosphat



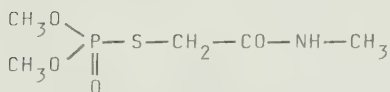
Methyldemeton (Metasystox)

O,O-Dimethyl-O-2-(ethylmercapto)-ethylthionophosphat



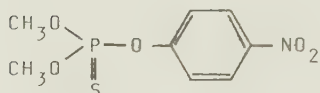
Omethoat (Folimat)

O,O-Dimethyl-S-(N-methylcarbamoylmethyl)-monothiophosphat



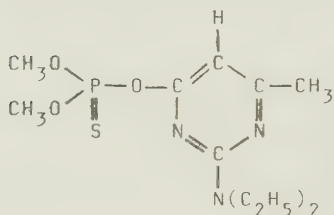
Parathion-methyl (ME 605 u.a.)

O,O-Dimethyl-O-(4-nitro-phenyl)-monothiophosphat



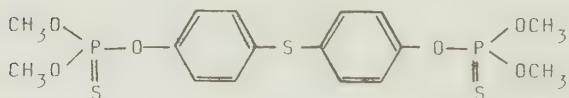
Pirimiphos-methyl (Actellic 25, Actellic 50)

O,O-Dimethyl-O-(2-diethylamino-6-pyrimidin-4-yl)-thiophosphat



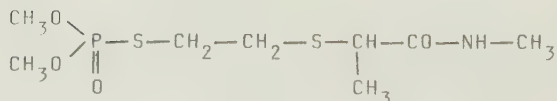
Temephos (Abate, Abathion, Abat, Swebate, Nimitex, Biothion)

O,O,O',O'-Tetramethyl-O,O'-thiodi-p-phenylen-dithiophosphat



Vamidothion (Trucidor, Kilval)

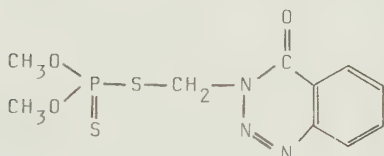
N-methyl-3-thio-2-methyl-valeramid der O,O-Dimethylthiophosphorsäure



Liste 3: Derivate der Dimethyldithiophosphorsäure

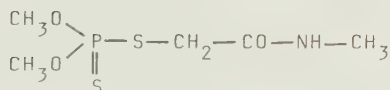
Azinophos-methyl (Guthion, Gusathion)

O,O-Dimethyl-S-(4-oxo-3H-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-methyl-dithiophosphat



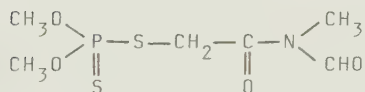
Dimethoat (Rogor, Perfekthion, Roxion u.a.)

O,O-Dimethyl-S-(2-oxo-3-aza-butyl)-dithiophosphat



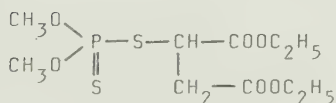
Formothion (Aflix, Anthio)

O,O-Dimethyl-S-(3-methyl-2,4-dioxo-3-aza-butyl)-dithiophosphat



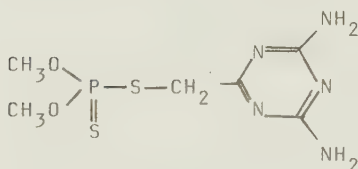
Malathion (Karbofos, Malathon)

S- 1,2-bis(ethoxy-carbamyl)ethyl -O,O-dimethyl-dithiophosphat



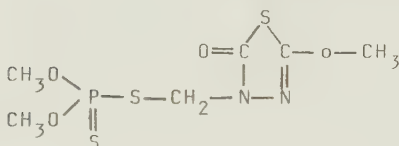
Menazon (Sayphos, Saphizon, Azidithion)

S- 4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl -O,O-dimethyl-
dithiophosphat



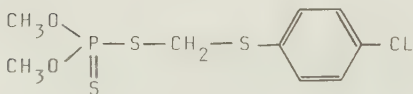
Methidathion (Ultrazid, Suprazid)

O,O-Dimethyl-S-(2-methoxy-1,3,4-thiadiazol-5-yl)-
4-methyl)-dithiophosphat



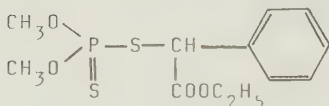
Methyl-Trithion (Stauffer)

O,O-Dimethyl-S-(p-chlorophenyl-thiomethyl)-dithio-
phosphat



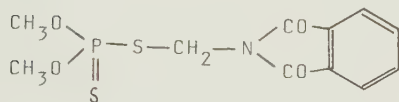
Phentoat (Cidial)

O,O-Dimethyl-S- -ethoxycarbonyl-benzyl-dithiophosphat



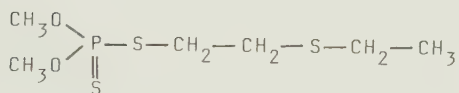
Phosmet (Imidan, Prolate)

O,O-Dimethyl-S-phtalimidomethyl-dithiophosphat



Thiometon (Ekatin, Ebizid)

O,O-Dimethyl-S(2-ethylmercapto-ethyl)-dithiophosphat



B ÜBERBLICK ÜBER BISHER VORLIEGENDE VERÖFFENT-
LICHUNGEN ZUM NACHWEIS VON DIMETHYLPHOSPHAT
UND DIMETHYLTHIOPHOSPHAT

Mit dem Nachweis der Dialkylphosphorsäuren, -thio-
phosphorsäuren und -dithiophosphorsäuren und den
daraus resultierenden Möglichkeiten eines Screening-
Verfahrens für Alkylphosphatvergiftungen oder stoff-
wechselphysiologischen Untersuchungen haben sich bereits
eine Reihe von Autoren befaßt.

Fischer und Otterbeck (1959), Fischer und Klingelhöller
(1960) sowie Fischer und Plunger (1964) beschreiben
den Nachweis von Thiophosphorsäureestern (TPE) mittels
Dünnschichtchromatographie. Dazu werden die Proben von
biologischem Material mit Lauge gekocht und die Spalt-
produkte aus der Lösung ausgeschüttelt. Dies sind ein-
mal die Rumpfmoleküle (Diethyl- und Dimethylverbindungen)
und andererseits die für die jeweilige Verbindung
charakteristische Gruppe, wie z.B. das Nitrophenol
für E 605. Der Nachweis erfolgt nach Aufbringen der
Proben auf Dünnschichtplatten mit Kieselgel G - Merck,
und Entwicklung mit verschiedenen Laufmitteln durch
Besprühen mit Jodazid-Reagens. Es entsteht dort ein
weißer Fleck, wo sich schwefelhaltige Substanz befindet.

Die Nachweisempfindlichkeit wird für die TPE mit 1 - 3 µg
angegeben. Geldmacher - v. Mallinckrodt (1964) verwendet
statt des sehr empfindlichen, aber relativ unspezifischen
Jodazid-Reagens für die Entwicklung N-Bromsuccinimid-
Fluorescein (Cook, 1954), und weist darauf hin, daß mit
dem o.g. Verfahren die neben Dimethyl- und Diethyl-
thiophosphorsäure entstehenden schwefelfreien Phosphor-
säurederivate nicht erfaßt werden können.

Mit dem dünn-schichtchromatographischen Nachweis von Phosphorsäureestern und ihren Metaboliten haben sich weiterhin Lamotte und Merlin (1968) sowie Bloom (1972) befaßt.

Askew et al. (1969) beschrieben eine gaschromatographische Untersuchungsmethode für ein allgemeines Screening von phosphoorganischen Insektiziden und deren Metaboliten in Nahrungsmitteln. Die Extraktion der Alkylphosphate aus der Lösung nach alkalischer Hydrolyse erfolgt mit Chloroform, die Alkylierung für die gaschromatographische Messung mit Diazomethan. Unter Verwendung einer mit Versamid 900 beschichteten Säule und eines Phosphor-spezifischen Flammenionisationsdetektors beträgt die maximale Empfindlichkeit für die verschiedenen Alkylphosphate ca. 0,1 ng. Allerdings können hier durch die Verwendung von Diazomethan als Alkylierungsmittel all jene Insektizide (Demeton-S-methyl, Dichlorvos, Mevinphos, Phosphamidon, Trichlorphon u.a.) nicht nachgewiesen werden, die Dimethylphosphat als Spaltprodukt aufweisen. Dimethylphosphat erscheint nach Methylierung ebenso wie methyliertes anorganisches Phosphat als Trimethylphosphat und ist von diesem nicht zu unterscheiden.

Aufbauend auf die Arbeiten von Guteman et al. (1968) und St.John und Lisk (1968) stellen Shafik und Enos (1969) eine verbesserte gaschromatographische Methode zu gleichzeitigem Nachweis und Trennung der sechs o.g. Hauptmetaboliten von Insektiziden auf Alkyl(thio)phosphatbasis in menschlichem Blut und Urin vor. Die Extraktion der Alkylphosphate erfolgt hier mit einem V/V (1:1) - Gemisch aus Azetonitril und Diethylether, die eine Hälfte des Extraktes wird mit Diazomethan methyliert, die andere Hälfte mit Diazoethan ethyliert. Die Alkylierungsrate wird mit 100 % angegeben, die Extraktionsausbeuten

für die sechs Hauptmetaboliten DMP, DMTP, DMDTP und DEP, DETP, DEDTP mit 80 - 100 %. Die gaschromatographische Messung erfolgt auf einem MikroTek MT 220 Gaschromatograph mit Flammenphotometer-Detektor für Phosphor- und Schwefel-Filter unter Verwendung einer mit 20 % Versamid 900 auf 60 - 80 mesh Gas Chrom Q sehr hoch belegten Säule. Durch die zweigleisige Alkylierung des aufgeteilten Extraktes mit Diazomethan und Diazoethan tritt zwar das anorganische Phosphat als TMP oder als TEP auf und verhindert die Auswertung des methylierten DMP (= TMP) oder des ethylierten DEP (= TEP), ethyliertes DMP und methyliertes DEP kann jedoch problemlos erfaßt werden. Die Nachweisgrenze für die Alkylderivate liegt im Nanogrammbereich.

Shafik et al. (1970) untersuchen die Reaktionsprodukte von ethyliertem und methyliertem Diethylthiophosphat und finden eine Verteilung von 67,5 % O,O-S-Triethylthiophosphat und 37,5 % O,O,O-Triethylphosphat im ethylierten Ansatz sowie 85 % O,O-diethyl-S-methyl-thiophosphat und 15 % O,O-diethyl-S-methyl-thiophosphat im methylierten Ansatz. Diese Isomerisierung wurde für alkyliertes DMTP nicht festgestellt. Shafik et al. (1971) stellen eine der Messung nach o.g. Verfahren vorgeschaltete Reinigung und Fraktionierung der Extrakte von Alkyl(thio)phosphaten aus menschlichem Urin vor. Aus dem konzentrierten Azetonitril-Ether-Extrakt (s.o.) wird nach Verdünnung 1:20 mit H₂O und Zugabe von NaCl ein Benzolextrakt hergestellt und dieser in eine präparierte Kieselgelsäule eingebracht. Durch Elution mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln erhält man 3 Fraktionen. Die erste enthält methylierte und ethylierte O-alkylierte Thio- und Dithiophosphate, die zweite die methylierten und ethylierten S-alkylierten Diethylthiophosphate, die dritte methyliertes und ethyliertes DEP sowie ethyliertes DMP. Der größte Teil des TMP verbleibt

in der Kieselgelsäule. Die weitere gaschromatographische Messung der Eluate erfolgt nach o.g. Methode von Shafik et al. (1969). Die Wiederfindungsrate eingesetzter Standards aus Urin wird wieder mit 80 - 100 % angegeben. Die Nachweisgrenzen im Urin verbessern sich durch dieses Cleanup um den Faktor 5 - 10.

Shafik et al. (1973) modifizieren die Methode von Shafik et al. (1971). Sie verwenden statt der zweigleisigen Alkylierung mit Diazomethan und Diazoethan als Reagens Diazopentan, dadurch erscheint anorganisches Phosphat als Triamylphosphat und verliert so jeden störenden Einfluß. Das Verfahren wird abgekürzt und vereinfacht, die Messungen erfolgen unter Verwendung eines 2-Flammen-Photometerdetektors, schwefel- und phosphorspezifisch, und einer mit 5 % OV-210 auf Chromosorb W H.P., 80 - 100 mesh beschichteten Säule. Durch ein vorgeschaltetes Cleanup über eine Kieselgelsäule verbessern sich die Extraktionsausbeuten auf 95 - 100 %, die maximale Detektor-Empfindlichkeit für die Amyl-Derivate liegt bei 0,1 ng.

Blair und Roderick (1976) beschreiben speziell den gaschromatographischen Nachweis von DMP aus wäßriger Lösung (Urin). Anorganisches Phosphat wird selektiv mit Calciumhydroxid entfernt, die Probe wird nach Ansäuerung über einen Kationenaustauscher (Amberlite JR-120(H)) mit Diazoethan alkyliert und die Probe darauf in Ethanol aufgenommen. Zur gaschromatographischen Messung werden verwendet ein Phosphor-spezifischer Flammenphotometerdetektor und eine mit 5 % Carbowax 6000 auf 80 - 100 mesh Gas Chrom Q beschickte Säule. Die Wiederfindungsrate von DMP wird mit 95 % angegeben, die Nachweisgrenze für das Natriumsalz der Dimethylphosphorsäure liegt bei 50 ng/ml entsprechend einer maximalen Detektorempfindlichkeit von 0,5 ng.

Eine weitere Möglichkeit zum gaschromatographischen Nachweis von Alkyl(thio)phosphaten beschreiben Daughton et al. (1976). Sie bearbeiten große Volumina wäßriger Lösungen mit niedrigen Konzentrationen an phosphoorganischen Insektiziden mit dem Fernziel der Umweltüberwachung auf Dialkyl(thio)phosphatbelastung. Als Alkylierungsreagens findet Diazomethan Verwendung. Der Thermionische Detektor (TID) ist phosphorspezifisch, die Säule ist zu gleichen Teilen mit 15 % QF₁ und 10 % DC-200 auf Gas Chrom Q (80 - 100 mesh) beschickt. Die Probe (pH 1,25) wird auf Amberlite XAD-U (pH 1,25) aufgebracht und, in Azeton aufgenommen, eluiert. (Dieser Schritt dient der Vorkonzentration großer Volumina auf ca. 30 ml). Die Probe wird nach Ansäuern und Aussalzen mit NaCl methyliert und gaschromatographisch gemessen. Es sind dazu drei Wege beschrieben, anorganisches Phosphat vollständig zu eliminieren, damit methyliertes DMP sicher quantifiziert werden kann. Zur Anwendung der Meßvorschrift auf größere Mengen Urin muß dieser säulenchromatographisch vorgereinigt werden. Die Extraktionsausbeuten bei Extraktion mit Ethylacetat bzw. Acetonitril-Diethylether (1:1) werden mit 85 - 100 % für DEP, DETP und DMTP angegeben, jedoch nur mit 50 % für DMP. Die hohen Wiederfindungsraten von Shafik et al. (1973) konnten nicht bestätigt werden.

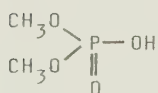
Die von Shafik et al. (1969) erarbeitete Vorschrift für die gaschromatographische Trennung der Dialkylphosphate und -thiophosphate findet Anwendung bei Jaglan et al. (1970) in einer Untersuchung über den Nachweis von DMP und DMTP (Nachweisgrenze hier 0,1 - 0,4 ng), bei Lores und Bradway (1977), die eine verbesserte Extraktion von Pestizid-Metaboliten aus Urin durch Verwendung eines Ionenaustauschers beschreiben (Extraktionsausbeuten 85 - 100 %), bei Comer et al. (1976) in einer Untersuchung über die Stabilität der verschiedenen Metaboliten von Parathion

im Urin bei Vergiftungen, sowie bei Riemer et al. (1978) und Richards et al. (1978) in Untersuchungen von beruflich Pestizid-exponierten Personen und bei Davis et al. (1972) in einer stoffwechselphysiologischen Untersuchung auf Metaboliten von Parathion.

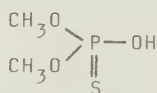
Keine der o.g. Vorschriften zur gaschromatographischen Trennung der Dialkylphosphate und Thiophosphate hat bisher Eingang in die alltägliche klinische Toxikologie, insbesondere der BRD, gefunden.

C PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit sollte sich mit der gaschromatographischen Trennung und dem Nachweis der Dimethylphosphorsäure (DMP) und der Dimethylthiophosphorsäure (DMTP) befassen.



Dimethylphosphorsäure
(DMP)

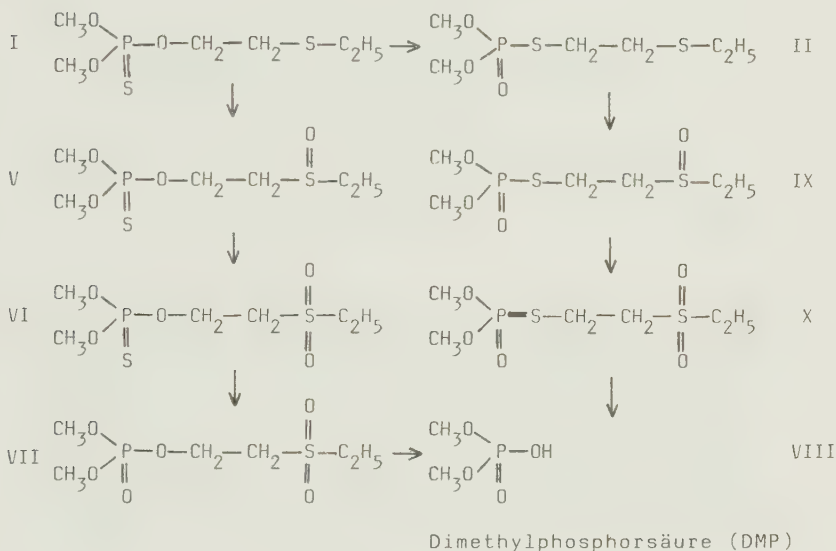


Dimethylthiophosphorsäure
(DMTP)

Diese beiden Verbindungen erhält man als Hydrolyseprodukte bei der in vitro-Verseifung einer großen Zahl phosphoorganischer Insektizide. Sie sind aber auch beim Abbau derartiger Insektizide im Warmblüterorganismus als Metaboliten, die im Urin ausgeschieden werden, von Interesse. Als Beispiel sei hier das Abbauschema von Metasystox R (Methyldemeton) genannt:

"Die Umwandlung und Entgiftung von Metasystox in der Pflanze und im Warmblüterorganismus verläuft über verschiedene Oxydationsstufen zur nicht mehr gebundenen O,O-Dimethylphosphorsäure. Diese wird schließlich zur Phosphorsäure hydrolysiert." Schematisch kann der Vorgang folgendermaßen dargestellt werden (Schrader, 1963):

Abb. 1: Schematischer Stoffwechsel des Metasystox
in Pflanze und Warmblüter



Durch den Nachweis der Verbindungen DMP und DMTP ergibt sich theoretisch die Möglichkeit, ein klinisch-toxikologisches Screeningverfahren zu erstellen, das sich sowohl zum Einsatz bei akuten Alkylphosphatvergiftungen als auch zur Kontrolle von Arbeitsplatzbelastungen mit Insektiziden, stoffwechselphysiologischen Untersuchungen und Ähnlichem eignen würde.

Zur gaschromatographischen Trennung und dem Nachweis von Dialkylphosphaten und -thiophosphaten existieren bereits eine Reihe von Arbeitsvorschriften (s.S.18 ff). Diese Methoden fanden, wie bereits erwähnt, zwar Anwendung in einigen wissenschaftlichen Untersuchungen, einen Eingang in die alltägliche klinische Toxikologie

haben sie jedoch bisher nicht gefunden.

Aufgabe dieser Arbeit war es nun, die o.g. Methoden für das Fernziel der Entwicklung eines klinisch-toxikologischen Screening-Verfahrens zu modifizieren. Der Arbeitsaufwand sowie der zeitliche Aufwand für eine Messung sollte in zumutbaren Grenzen gehalten werden, dazu sollte mit möglichst gängigen Geräten und Chemikalien gearbeitet werden. Diese Bedingungen führten zwangsweise in einigen Punkten zu Kompromißlösungen.

Bei der Ausarbeitung der Arbeitsvorschriften für die Extraktion, Derivatisierung und gaschromatographische Trennung der Verbindungen DMP und DMTP sollten auch die analogen Diethylverbindungen DEP und DETP miteinbezogen werden, was im Hinblick auf ein allgemeines Screening-Verfahren von Bedeutung ist. In der vorliegenden Arbeit soll jedoch auf die Diethylderivate nicht näher eingegangen werden. Siehe hierzu Müller, R. (1983).

Weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, gängige dünnschichtchromatographische Meßmethoden als qualitative Kontrollmethoden im Vergleich zu den Ergebnissen unserer gaschromatographischen Messungen anzuwenden. Im Hinblick auf die angestrebte Einsatzfähigkeit der Methode für die Toxikologie von Alkylphosphatvergiftungen sollte das zu entwickelnde Analyseverfahren nach Möglichkeit nicht nur für Urin, sondern auch für andere biologische Materialien, wie z.B. Blut, Serum oder Mageninhalt anwendbar sein. Schließlich sollte die so modifizierte Methode zur gaschromatographischen Trennung und zum Nachweis von DMP und DMTP im Urin anhand klinischer Fallbeispiele auf ihre praktische Anwendbarkeit getestet werden.

D ENTWICKLUNG EINER GASCHROMATOGRAPHISCHEN
 NACHWEISMETHODE FÜR DIMETHYLPHOSPHAT UND
 DIMETHYLTHIOPHOSPHAT

1. Gaschromatographische Trennung von Dimethyl-
 phosphat und Dimethylthiophosphat

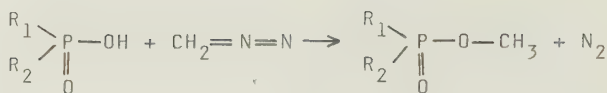
1.1. Derivatisierung für die Gaschromatographie

1.1.1. Allgemeine Gesichtspunkte zur Derivatisierung
 mittels Alkylierung

Für eine gute gaschromatographische Trennung haben die zu trennenden Substanzen einige Voraussetzungen zu erfüllen. Sie müssen relativ leicht flüchtig, ausreichend stabil und chemisch inert sein, d.h. sie dürfen sich nicht dicht oberhalb der Verdampfungstemperatur oder beim Kontakt mit der Trennsäule zersetzen. Nur unter diesen Voraussetzungen sind scharfe, symmetrische Peaks zu erreichen (Drozd, 1975).

Die zu untersuchenden Dialkylphosphate erfüllen diese Bedingungen zunächst noch nicht, da sie durch ihre freie OH-Gruppe zu polar und reaktionsfreudig sind. Die Blockierung dieser OH-Gruppe ist die Voraussetzung für die gaschromatographische Trennbarkeit.

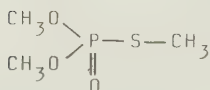
Dazu beschreiben Shafik et al. (1969, 1970, 1973) sowie auch viele andere Autoren die Alkylierung mit einem entsprechenden Alkylierungsmittel als geeignete Methode. Das einfachste Verfahren stellt die Methylierung mittels Diazomethan dar, eine in der gaschromatographischen Derivatisierung sehr gängige Methode. Für einen Phosphorsäurediester läßt sich allgemein folgende Reaktion formulieren (Drozd, 1975):



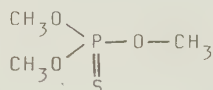
Die Methylierung von Dimethylphosphorsäure (DMP) liefert das für gaschromatographische Untersuchungen grundsätzlich gut geeignete Trimethylphosphat (TMP):



Die Methylierung der Dimethylthiophosphorsäure (DMTP) liefert nach Daughton et al. (1976) zwei isomere, ebenfalls geeignete Reaktionsprodukte, das S-Methyl-O,O-dimethylthiophosphat (S-mDMTP) sowie das O-Methyl-O,O-dimethylthiophosphat (O-mDMTP):



S-Methyl-O-O-dimethyl-
thiophosphat (S-mDMTP)



O-Methyl-O-O-dimethyl-
thiophosphat (O-mDMTP)

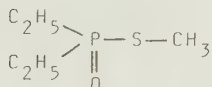
Nach der Untersuchung von Daughton et al. (1976) entsteht bei Alkylierung von Dimethylthiophosphorsäure mit Diazomethan in einem polaren Lösungsmittel wie Methanol zu mehr als 90 % die S-methylierte und zu weniger als 10 % die O-methylierte Form.

Bei der Methylierung von Diethylphosphorsäure erhält man das für gaschromatographische Untersuchungen eben-

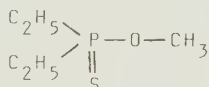
falls gut geeignete Monomethyl-diethylphosphat (mDEP):



Bei der Methylierung der Diethylthiophosphorsäure (DETP) erhält man nach Shafik et al. (1970) zwei isomere, zur Gaschromatographie geeignete Reaktionsprodukte, das S-Methyl-O,O-diethyl-thiophosphat (S-mDETP) und das O-Methyl-O,O-diethyl-thiophosphat (O-mDETP):



S-Methyl-O,O-diethyl-
thiophosphat (S-mDETP)

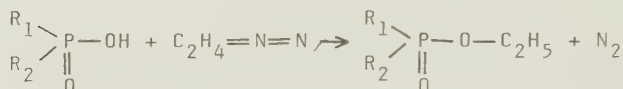


O-Methyl-O,O-diethyl-
thiophosphat (O-mDETP)

Nach Untersuchungen von Shafik et al. (1970) entsteht unter den von ihnen angegebenen Versuchsbedingungen zu 85 % die S-methylierte und zu 15 % die O-methylierte Form.

Bei Anwesenheit von Dimethylphosphat im zu analysierenden Ansatz ergab sich ein Problem: in biologischem Untersuchungsmaterial wie z.B. Serum oder Urin ist anorganisches Phosphat enthalten, das in kleinen Mengen mit in den Extrakt übergeht und bei Methylierung ebenfalls TMP liefert. Es ist also nicht möglich, DMP im methylierten Ansatz zu bestimmen, da es von anorganischem Phosphat nicht zu unterscheiden ist (Askew et al., 1969; Shafik und Enos, 1969).

Shafik und Enos (1969) beschreiben als Möglichkeit zur Lösung dieses Problems die Ethylierung mit Diazoethan, die analog zur Methylierung allgemein nach folgender Reaktion abläuft:



Die Thiophosphate DMP und DETP liefern bei Ethylierung ebenfalls zwei isomere Alkylierungsprodukte. Nach Shafik et al. (1970) entstehen hier bei Ethylierung von DETP zu 37,5 % O-ethyl-0,0-diethylthiophosphat und zu 62,5 % S-ethyl-0,0-diethylthiophosphat.

Allerdings kann bei der Ethylierung DEP nicht von anorganischem Phosphat unterschieden werden, da beide Verbindungen Triethylphosphat (TEP) ergeben:



Daher muß bei einem allgemeinen Screening jeder Extrakt sowohl methyliert als auch ethyliert bearbeitet werden, wobei DMP im ethylierten und DEP im methylierten Ansatz zu bestimmen ist (Shafik und Enos, 1969). Diese zweigleisige Derivatisierung wäre nicht notwendig, wenn die Einföhrung längerer Alkylketten mittels Propylierung, Butylierung oder Amylierung erfolgen würde (Shafik et al., 1973). Diese Methode scheitert jedoch daran, daß die hierfür benötigten längerkettigen Alkylierungsmittel nicht mehr im Fachhandel erhältlich sind. Sie werden in der Industrie im Gegensatz zu den Methylierungs- und

Ethylierungsmitteln kaum benötigt und aufgrund ihrer Gefährlichkeit und canzerogenen Eigenschaften nur noch in kleinen Mengen zu Forschungszwecken hergestellt. Da das Ziel dieser Arbeit sich auf die Anwendbarkeit der Methode in der klinischen Toxikologie richtete, war es ausschlaggebend, nur mit allgemein erhältlichen Chemikalien zu arbeiten. Daher wurde die umständlichere, zweigleisige Derivatisierung herangezogen, um DMP, DEP, DMTP und DETP nebeneinander zu bestimmen. Durch die zweimalige Messung ergibt sich zudem eine gute Absicherung der Meßergebnisse, die besonders bei den Thiophosphaten von Bedeutung ist.

Wir konnten bei der Alkylierung der Thiophosphate DMTP und DETP beobachten, daß die quantitative Verteilung der beiden isomeren Reaktionsprodukte (s.o.) stark von den Reaktionsbedingungen beeinflußt wird, ein Effekt, den wir im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersuchen konnten. Besondere Bedeutung kommt hier der Reaktionszeit zu, außerdem scheint auch noch nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zerstörung des Alkylierungsmittels im Ansatz noch eine Isomerisierung abzulaufen.

Quantitative Bestimmungen wurden dadurch erschwert, daß wir aus organisatorischen Gründen manche Versuchsbedingungen, insbesondere die Zeitspanne zwischen Derivatisierung und gaschromatographischer Messung, nicht konstanthalten konnten. Zur Vereinfachung legten wir für die Quantifizierungen immer die Summe der Peakflächen der beiden isomeren Reaktionsprodukte zugrunde. Dabei mußten wir von der eigentlich unzulässigen, weil nicht bewiesenen Annahme ausgehen, daß die Detektorempfindlichkeit für beide Isomeren gleich groß ist. Geeignete Reinsubstanzen für die Untersuchung dieses Problems waren jedoch leider nicht verfügbar. Das

Auftreten der beiden korrespondierenden Peaks bietet allerdings auch den Vorteil der zusätzlichen Kontrollmöglichkeit und Absicherung der Meßergebnisse.

1.1.2. Herstellung der Alkylierungsmittel

1.1.2.1. Theoretische Grundlagen

Das zur Derivatisierung benötigte Alkylierungsmittel Diazomethan wurde wie bei Shafik und Enos (1969) aus N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), analog Diazoethan aus N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (ENNG) hergestellt.

MNNG bzw. ENNG setzen Diazomethan bzw. Diazoethan bei Behandlung mit wäßrigen Basen, z.B. KOH, frei:



Ein Vorteil dieser Methode, z.B. gegenüber der Präparation aus N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamid (Diazald^R), liegt darin, daß mit wäßriger KOH gearbeitet werden kann, während Diazald^R eine alkoholische Base erfordert und damit schwieriger zu verarbeiten ist.

Von Nachteil sind bei MNNG und ENNG vor allem ihre stark mutagene Wirkung und die hohe Giftigkeit; außerdem sind Allergien gegen diese Substanz bekannt.

1.1.2.2. Arbeitsvorschrift für die Herstellung eines Alkylierungsmittels

Bei der Herstellung eines Diazoalkanreagenzes auf Etherbasis bewährte sich folgendes praktisches Vorgehen nach Shafik und Enos (1969):

In einem sauberen, nicht verkratzten Weithalserlen-meyerkolben werden 2,3 KOH-Plätzchen in 2,3 g H₂O bidest. gelöst. Nach Abkühlung werden 25 ml Diethylether zugegeben und der Kolben für einige Minuten in der Tiefkühltruhe bei -18 °C gekühlt. Dann fügt man 1,5 g MNNG oder 1,6 g ENNG in kleinen Portionen innerhalb einiger Minuten zu. Nach jeder Zugabe wird der Kolben gut geschüttelt und die Gasentwicklung abgewartet. Dann wird die (durch Verunreinigungen) gelb gefärbte Etherphase in ein sauberes, nicht verkratztes Reagenzglas dekantiert. Dieses wird mit einem Teflonstopfen dicht verschlossen und bei -18 °C aufbewahrt.

Wichtig:

Alle diese Arbeiten müssen mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille im Abzug ausgeführt werden. Auf die Gefährlichkeit des MNNG und ENNG wurde bereits hingewiesen. Das entstehende Diazomethan bzw. Diazoethan ist außerdem hochexplosiv. Daher dürfen keine Schliffglasgeräte oder verkratzte bzw. angeätzte Glaswaren verwendet werden, da sich Diazomethan an rauen Oberflächen explosionsartig zersetzen kann.

Die Verhältnisse der eingesetzten Chemikalien dürfen nicht verändert werden, die absoluten Mengen dagegen können bei entsprechendem Bedarf erhöht werden. Das Reagens ist bei -18 °C gelagert bis zu einer Woche lang verwendbar, es wird sinnvollerweise also immer etwa der

Wochenbedarf hergestellt. Bei Beachtung aller dieser Hinweise und Vorrichtungsmaßregeln hat sich dieses Herstellungsverfahren für kleine Mengen gut bewährt.

Eine größere geschlossene Apparatur zur Darstellung und Destillation von Diazomethan bzw. Diazoethan wäre bei höherem Bedarf in Erwägung zu ziehen, insbesondere, wenn die Alkylierungsmittel auch für andere Derivatisierungen benötigt werden.

1.1.3. Alkylierungsreaktion

Bei der Methylierung nach Shafik und Enos (1969), die unbedingt im Abzug erfolgen muß, werden 100 µl einer nicht wäßrigen Lösung von DMP oder DMTP (z.B. in Diäthyl-ether) oder eines zu untersuchenden Extraktes mit 20 µl Methanol und 200 µl Diazomethanreagens auf Etherbasis versetzt. Falls dann noch Gasentwicklung und Entfärbung beobachtet werden und keine bleibende Gelbfärbung erreicht wird, muß weiter Diazomethanreagens zugesetzt werden, bis die bleibende Gelbfärbung schließlich einen Überschuß anzeigt. Der Ansatz wird bei Zimmertemperatur 30 min im Abzug stehengelassen. Anschließend wird der noch vorhandene Überschuß an Reagens durch Zugabe von 10 µl (entsprechend 1 Tropfen) Ameisensäure 98 - 100 % zerstört (Blau und King, 1978). Die Verwendung von HCOOH hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, daß hierbei keine Substanzen im Ansatz entstehen, die die gas-chromatographische Messung stören könnten.

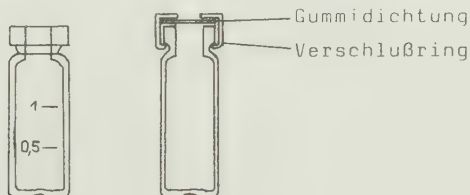
Analog der Methylierung erfolgt die Ethylierung, ebenfalls nach Shafik und Enos, (1969), mit 100 µl DMP- oder DMTP-Lösung bzw. Extrakt, 20 µl Ethanol und 200 µl Diazoethan, bei Bedarf entsprechend mehr. Die Alkylierung

kann, wenn die Möglichkeit zur sofortigen gaschromatographischen Messung besteht, an sich im Reagenzglas erfolgen. Der als Lösungsmittel dienende Ether ist jedoch sehr leicht flüchtig und es handelt sich um sehr kleine Volumina. Deshalb hat es sich für Reihmessungen und halbquantitative Analysen bewährt, die Reaktion in möglichst graduierten Gaschromatographie-Probenfläschchen (s. Abb. 2) mit einem Inhalt von ca. 1,5 ml durchzuführen, die sofort nach Zerstörung des Reagensüberschusses mit HCOOH mit einem dichten Verschuß mit durchstechbarer Gummimembran versehen werden. Die Graduierung dieser Fläschchen kann auch selbst durchgeführt werden, falls keine Normfläschchen zur Verfügung stehen.

Die Messung muß dann nicht unmittelbar nach der Alkylierung erfolgen, da der Ansatz in diesem Fläschchen einige Stunden bis Tage haltbar ist. Außerdem hätte man die Möglichkeit, einen automatischen Probengeber am Gaschromatographen einzusetzen, wodurch der Arbeitsaufwand bei Reihmessungen wesentlich reduziert würde.

Abbildung 2:

Probenfläschchen für die Gaschromatographie
(Abbildung in Originalgröße)



1.1.4. Ausschluß von Störungen der gaschromatographischen Messung durch die Alkylierungsmittel

Da erfahrungsgemäß im Diazomethan- bzw. Diazoethanreagens einige Substanzen enthalten sind, die bei hoher Empfindlichkeit des Gaschromatographen Peaks und damit u.U. Verwechslungsmöglichkeiten mit den gesuchten Substanzen liefern können, ist zu empfehlen, das Reagens nach der Herstellung jeweils mit einem "Leeransatz" zu testen. Dazu werden 100 µl Diethylether mit 20 µl Methanol bzw. Ethanol und 200 µl Diazomethan- bzw. Diazoethanreagens versetzt und nach 30 min tropfenweise Ameisensäure (98 - 100 %) bis zur Entfärbung zugesetzt. Durch die nachfolgende gaschromatographische Messung werden sowohl Verunreinigungen durch das Alkylierungsmittel als auch Störsubstanzen in Ether, Methanol oder Ethanol erfaßt.

Das Auftreten der Störpeaks ließe sich wahrscheinlich zum größten Teil dadurch vermeiden, daß das Alkylierungsreagens in einer größeren geschlossenen Apparatur dargestellt und destilliert würde, wie in der präparativen Chemie üblich. Ein derartiger Aufwand kam für unsere Arbeiten nicht in Frage, daher mußten wir durch die Art der Darstellung verursachte Verunreinigungen in Kauf nehmen.

1.1.5. Ausbeuten bei der Derivatisierung

Die Ausbeuten bei der Alkylierung konnten für die Methylierung von DMP im Vergleich zur Reinsubstanz TMP bestimmt werden. Es zeigte sich eine praktisch quantitative Umsetzung (Methylierung von DMP: 98,8 % als Mittelwert aus 4 Messungen, vgl. S. 53; ähnliches Er-

gebnis für die Ethylierung von DEP im Vergleich zu TEP).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Shafik und Enos (1969) konnte auch für die Methylierung und Ethylierung eines KH_2PO_4 -Standards, der in Methanol bzw. Ethanol angesetzt wurde, eine praktisch vollständige Umsetzung im Vergleich zu den TMP- und TEP-Standardsubstanzen nachgewiesen werden. Für die Ethylierung von DMP und für die Alkylierung der Thio-phosphate war eine Kontrolle der Ausbeuten nicht möglich, da die entsprechenden Trialkyl(thio)phosphat-Standards nicht zu beschaffen waren. Aufgrund der guten Ausbeute bei der Methylierung von DMP und aus dem Peak-höhenvergleich bei der gaschromatographischen Messung kann auch hier auf gute Ausbeuten geschlossen werden. Die genauen Werte waren dabei nicht von entscheidender Bedeutung, da die Aufstellung der Eichkurven für quantitative Bestimmungen sich auf den Gehalt an Dialkylphosphaten bezieht und damit den Derivatisierungsschritt mit einschließt.

1.2. Gaschromatographische Trennung

1.2.1. Gerätedaten und Detektortyp

Trialkylphosphate und -thiophosphate, wie sie bei der o.g. Derivatisierung entstehen, sind für eine gaschromatographische Trennung gut geeignet. Es werden in den zu diesem Thema bisher veröffentlichten Arbeiten (vor allem Shafik und Enos, (1969); Shafik et al. (1973); Jaglan et al. (1970); Daughton et al. (1976); Blair und Roderick (1976); Lores und Bradway (1977)), eine Vielzahl verschiedener gaschromatographischer Methoden und

Arbeitsanleitungen beschrieben, meist unter Verwendung von Flammenphotometer-Detektoren und Trennsäulen auf Polyamidharz- oder Silikonölbasis. Einige Autoren (Jaglan et al., 1970; Daughton et al., 1976) arbeiten auch mit Thermionischen Detektoren (TID), ebenfalls unter Verwendung verschiedenster Trennsäulen, Temperaturen und Gasströme. Wir benutzten für unsere Messungen einen Gaschromatograph von Hewlett Packard, Modell HP 5750 Research Chromatograph mit angeschlossenem Perkin-Elmer-Schreiber, Modell Nr. 56. Als Detektorsystem verwendeten wir einen N-FID-Detektor ("N-spezifischer Flammenionisationsdetektor") mit einem durch eine Knallgasflamme (H_2 /Luft) indirekt beheizten Alkalisalzkristall. Diese Detektorart spricht besonders auf Stickstoff im Molekül an, aber zusätzlich auch auf Phosphor und Halogene. Damit war er für das vorliegende Nachweisproblem geeignet.

Die Empfindlichkeit des Detektors wird durch Einstellen der Gasströme für die H_2 /Luft-Flamme, den Abstand des Kristalls von dieser Flamme und von der Temperatur des Detektorblocks bestimmt. Als optimal erwiesen sich eine Detektorblocktemperatur von 370 °C und folgende Gasströme: H_2 29 ml/min; Synthetische Luft 250 ml/min. Dabei hatte besonders der H_2 -Flow großen Einfluß auf die Empfindlichkeit, er mußte wegen Druckschwankungen im Hauptnetz als einziger einige Male nachreguliert werden. Die Einstellung der Gasströme erfolgt mit dem Blasenähler. Sie wurden, je nach Bedarf, im Abstand von einigen Tagen bis Wochen kontrolliert. Die Kristalloberfläche wurde täglich mit einem Glasfaserstift von Ablagerungen und Verunreinigungen befreit und der Abstand des Kristalls zur Flamme nach ausreichender Aufheizzeit neu optimiert.

Die Empfindlichkeit des Detektors unterliegt durch diese tägliche Wartung einer dauernden Veränderung, ist also nicht mehr reproduzierbar. Daher ergeben sich zur Durchführung quantitativer Messungen folgende Möglichkeiten:

- a) Es wird die Empfindlichkeit des Detektors täglich mit einem Vergleichsstandard auf den gleichen Wert gebracht.

Diese Methode erwies sich als zeitraubend und kaum praktikabel. Während eine ungefähre Optimierung der Empfindlichkeit problemlos möglich war, bereitete die Feineinstellung auf einen bestimmten Wert fast unüberwindliche Schwierigkeiten. Die Empfindlichkeit schwankte zudem auch im Tagesverlauf manchmal, sie mußte also kontinuierlich überprüft und nachgestellt werden.

- b) Zu quantitativen Messungen wird immer ein Vergleichsstandard bekannter Konzentration mitgeführt.

Diese Methode erwies sich als gut durchführbar, da Tagesschwankungen in der Empfindlichkeit keine Rolle spielten, die Auswertung mittels Eichkurve und aktueller Empfindlichkeit wurde allerdings arbeitsaufwendiger. Durch den Einsatz elektronischer Rechenprogramme ließe sich dieser Arbeitsschritt für Reihemessungen vereinfachen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode lag im Ausgleich von anderen Konstanthaltungsstörungen des Gaschromatographen. So wurden z.B. geringe Temperaturschwankungen der Ofenkammer, die sich in veränderten Retentionszeiten und Peakhöhen bemerkbar machten, am Standard erkennbar und führten nicht zu Fehlauswertungen.

Als geeignete Vergleichsstandards konnten Verdünnungen von TMP oder TEP in Benzol verwendet werden. Diese Lösungen sind leicht herzustellen, in Schliffgläsern mehrere Tage aufzubewahren, und die Retentionszeiten der Verbindungen sind relativ kurz, so daß sich der zeitliche Aufwand in Grenzen hält.

Der Nachteil dieser Methode liegt vor allem in der großen Zahl von möglichen Fehlern bei den vielen notwendigen Einzelschritten. Diese Fehler multiplizieren sich bei der Auswertung im Endresultat. Auch die relativ geringe Präzision mancher Messungen muß zum Teil dadurch erklärt werden.

1.2.2. Auswahl der Trennsäulen

Es mußte zunächst, für eine möglichst gute Trennung der verschiedenen Trialkyl(thio)phosphate, ein Säulenmaterial gefunden werden, das zu scharfen, symmetrischen Peaks führt, also kein Tailing erzeugt. Zur eigentlichen Trennung mußten dann Säulenlänge und Betriebstemperatur so verändert werden, daß bei möglichst geringer Gesamtlaufzeit der Abstand der Einzelpeaks für eine gute Auswertung groß genug war.

Folgende Trennsubstanzen (Liquid Phases, s. Tab. 1) und Trägermaterialien (Solid Supports, s. Tab. 2) wurden bei Vorversuchen verwendet:

(nach "Chromatography Columns and Supplies Catalog"
von Hewlett Packard)

Tabelle 1:

Liquid Phases

Silicone Gum Rubber SE-30	(methyl)
Silicone Gum Rubber UCC-W-982	(methylvinyl)
Silicone Gum Rubber OV-17	(methylphenyl)
Silicone Fluid FS-1265 (QF-1)	(trifluoropropylmethyl)
Silicone Oil DE-200	(methyl)
Carbowax 20 M	

Tabelle 2:

Solid Supports

Chromosorb W (AW-DMCS)	80 - 100
Chromosorb W HP (AW-DMCS)	80 - 100
Gaschrom Q (BW-DMCS)	80 - 100

Abkürzungen:

HP = High Performance

AW = acid washed dimethyldichlorsilane treated

BW = basic washed dimethyldichlorsilane treated

Im einzelnen wurden folgende Säulen hergestellt und getestet (Tab. 3):

Tabelle 3:

Säulen für die gaschromatographische Trennung

(1) 3 % Silicone SE-30	auf Chromosorb W (AW-DMCS)	80 - 100	} 1:1
(2) 10 % Silicone SE-30	auf Chromosorb W (AW-DMCS)	80 - 100	
(3) 10 % Silicone UCC-W-982	auf Chromosorb W HP (AW-DMCS)	80 - 100	
(4) 10 % Silicone OV 17	auf Chromosorb W HP (AW-DMCS)	80 - 100	
(5) 15 % Silicone QF 1	auf Gaschrom Q (BW-DMCS)	80 - 100	
10 % Silicone DC 200	auf Gaschrom Q (BW-DMCS)	80 - 100	
(6) 10 % Carbowax 20 M	auf Chromosorb W HP (AW-DMCS)	80 - 100	

Alle Trennsäulen wurden zunächst in 1,20 m langen Glassäulen mit 3 mm Innendurchmesser getestet. Dabei zeigte die 10 % Carbowax 20 M - Säule (6) die besten Ergebnisse. Allerdings erwies sich die 1,20 m lange Glassäule für eine ausreichend gute Trennung aller fraglichen Substanzen als zu kurz, so daß alle weiteren Versuche auf einer 1,80 m langen Glassäule mit 3 mm Innendurchmesser durchgeführt wurden.

Unter diesen Voraussetzungen erwiesen sich folgende Säule und folgende Bedingungen (siehe Abb. 26 und 27) als optimal für die durchzuführende Trennung:

Glassäule 1,80 m, Innendurchmesser 3 mm
10 % Carbowax 20 M auf Chromosorb W HP (AW-DMCS) 80 - 100
aufgeheizt von Zimmertemperatur auf 180 °C mit 1 °C/min
konditioniert 48 h bei 180 °C
Dauerbetriebstemperatur 120 °C (Einspritzblock 170 °C)

Als Trägergas wurde Helium verwendet, der Trägergasstrom wurde entsprechend den Empfehlungen des Geräteherstellers auf 40 ml/min bei einem Eingangsdruck von 5 bar eingestellt.

Unter den o.g. Bedingungen lagen die Laufzeiten aller für die Trennung in Frage kommenden Alkylphosphate und -thiophosphate zwischen ca. 3 und 15 min bei einem minimalen Peakabstand von ca. 30 sec.

Zur Herstellung der Trennsäulen wurde das von Paulus (1972) beschriebene Verfahren angewendet.

1.2.3. Gaschromatographische Messung der derivatisierten Untersuchungsansätze

1.2.3.1. Einspritztechnik

Von den alkylierten Lösungen bzw. Extrakten werden Proben von 0,5 - maximal 5 µl eingespritzt, die Laufzeit beträgt ca. 15 min. Es ist zu beachten, daß beim Auftreten späterer Peaks von Störsubstanzen, speziell aus dem Diazoalkanreagens, die Einzelmessungen länger laufen müssen, um eine Überlagerung der Störpeaks mit der nachfolgenden Messung zu vermeiden. Das Einspritzen sollte bei größeren Volumina (ab ca. 2 µl) zwar zügig, aber nicht zu abrupt erfolgen, da sonst die Gefahr besteht, daß durch die entstehende Druckwelle in der Säule die Detektorflamme gelöscht wird. Damit wird der gesamte Einzelmeßlauf unbrauchbar, da der Detektor auch bei sofortiger Neuzündung seine normale Empfindlichkeit erst nach einiger Zeit wieder erreicht.

Nach jedem Einspritzvorgang muß die Injektionsspritze sofort mehrfach mit Methanol gespült werden. Trotz dieser Maßnahme empfiehlt es sich, Meßreihen, z.B. zur Eichkurvenerstellung, bei niedrigen Konzentrationen zu beginnen und dann zu höheren überzugehen. Versuche haben gezeigt, daß trotz sorgfältigem Spülen der Spritze nach Aufziehen einer hochkonzentrierten Lösung 2 - 3 Einspritzungen lang Rückstände der Substanz nachweisbar sind, die eine empfindliche Messung bei niederen Konzentrationen erheblich stören können.

1.2.3.2. Vergleichsstandards

Als Vergleichsstandards für die aktuelle Detektorempfindlichkeit und die Retentionszeit wurden definierte Verdünnungen von TMP und TEP in Benzol benutzt (s.S. 53). Für die quantitative und halbquantitative Auswertung wurden Eichkurven erstellt. Dazu wurden Standardlösungen von Dialkyl(thio)phosphaten in Methanol hergestellt und methyliert, analog Standardlösungen in Ethanol ethyliert. Es ergaben sich für Konzentrationen der Größenordnung von 0,1 - 100 µg/ml lineare Zusammenhänge zwischen Peakfläche bzw. Peakhöhe und eingesetzter Substanzmenge. Hieraus ist die Berechtigung abzuleiten, nur mittels TMP- oder TEP-Standard die aktuelle Empfindlichkeit zur Zeit der Messung zu bestimmen und über die Umrechnung auf die Empfindlichkeit zur Zeit der Erstellung der Eichkurve zu halbquantitativen bzw. quantitativen Aussagen zu gelangen. Bei der Umrechnung auf eine ursprünglich wäßrige Untersuchungslösung ginge dann noch die Extraktionsrate ein.

Eine andere Möglichkeit besteht im Vergleich mit analog zu einer wäßrigen Untersuchungslösung behandelten wäßrigen Standardlösung der Dialkyl(thio)phosphate. Dabei werden zwar einige Rechenschritte und damit Fehlerquellen umgangen, der Arbeitsaufwand wird aber unverhältnismäßig höher.

1.2.3.3. Meßbereiche

Das richtige Einschätzen des Meßbereichs vor der Injektion ist unerlässlich für eine spätere Ausmeßbarkeit der Peaks. Es hat sich gezeigt, daß eine zu große Zahl von Meßbereichen, wie sie z.B. durch unterschiedliche

Wahl der Bandspreizung (Attenuation) erreicht werden könnte, nur zu Verwirrung führt und der praktische Nutzen gering ist. Daher wurde bei fast allen Messungen mit konstanter Attenuation "4" gearbeitet. Einzige Ausnahme war die Untergrenze des Meßbereichs bei höchster Empfindlichkeit, wo in wenigen Fällen auf Attenuation "2" übergewechselt wurde, um alle Möglichkeiten zur Steigerung der Empfindlichkeit auszunutzen.

Im Meßbereich Range 10^2 waren die Schwankungen der Nulllinie so stark, daß eine Auswertung praktisch unmöglich wurde. Im allgemeinen bewährte sich der Meßbereich Range 10^3 /Att.4 für niedrige Konzentrationen im Bereich von 1 µg/ml als empfindlichste Einstellung. Für mittlere Konzentrationen von ca. 10 µg/ml war Range 10^4 /Att.4 gut geeignet und für noch höhere Konzentrationen im Bereich von 100 µg/ml dann Range 10^5 /Att.4. Dabei war aber bereits die Grenze der Linearität der Eichkurven zu beachten.

1.2.3.4. Auswertung der gaschromatographischen Meßergebnisse

Da bei der langsamen Papier-Transportgeschwindigkeit von 5 mm/min, die wegen der langen Laufzeiten gewählt wurde, ein Ausmessen der Retentionszeit zu ungenau wäre, wurden die Zeiten von Hand mitgestoppt. Die Auswertung der Peakhöhen erfolgte durch nachträgliches Ausmessen der Peakflächen näherungsweise durch Berechnung aus gemessener Peakhöhe und Peakbreite bei halber Peakhöhe nach Graf (1966). Dabei wurde bei aufgesetzten Peaks die Grundlinienverschiebung berücksichtigt. Diese Art der Flächenberechnung ist für scharfe, symmetrische Peaks vertretbar, wenn auch

relativ ungenau. Da jedoch bei allen Schritten der Analyse ebenfalls relativ große Fehlermöglichkeiten gegeben sind, wurde auf präzisere Methoden der Auswertung, z.B. durch Planimetrie oder Auswiegen, keinen Wert gelegt. In der vorliegenden Durchführung kann die Methode mit gutem Gewissen sowieso nur als halbquantitativ, nicht als quantitativ bezeichnet werden.

Nebenbei bemerkt deckt sich diese Erfahrung mit den neuesten Angaben, die von der Arbeitsgruppe um M.T. Shafik (vgl. Shafik et al. 1969, 1973) eingeholt werden konnten (Soergel, 1981). Soweit wir erfahren konnten, wird die von dieser Arbeitsgruppe entwickelte Methode ebenfalls nur für qualitative, bestenfalls halbquantitative Arbeiten eingesetzt.

Zusammenfassung:

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mittels handgestoppter Retentionszeiten bei geeignetem Meßbereich eine qualitative Auswertung der gaschromatographischen Messung unproblematisch und sicher ist. Eine halbquantitative Aussage ist bei Mitführung eines Standards und vorhandenen Eichkurven möglich. Exakte quantitative Aussagen sind theoretisch ebenfalls möglich, erfordern jedoch einen höheren Arbeitsaufwand, eine präzisere Methode zur Auswertung und dazu sinnvollerweise eine bessere technische Ausstattung.

2. Eichkurven

Bei der Erstellung der Eichkurven standen folgende Reinsubstanzen zur Herstellung von Standardlösungen zur Verfügung (Fa. Bayer):

TMP (purum für GC, 98 %ig)

DMP (90 %ig) als NH_4^+ -Salz

DMTP (90 %ig) als NH_4^+ -Salz

TMP konnte direkt in Verdünnung bekannter Konzentration in Benzol eingesetzt werden. Von DMP und DMTP wurden Standardlösungen in Methanol bzw. Ethanol angesetzt und nach der oben beschriebenen Methode (s.S. 34 f) methyliert bzw. ethyliert. Für das methylierte DMP genügte es, die quantitative Umsetzung bei der Methylierungsreaktion im gesamten fraglichen Konzentrationsbereich nachzuweisen, so daß dann die Eichkurve für das Reaktionsprodukt TMP mit der Reinsubstanz erstellt werden konnte. Die anderen bei der Alkylierung als Reaktionsprodukte auftretenden Trialkyl(thio)phosphate waren als Reinsubstanzen leider nicht erhältlich.

Bei der Erstellung der Eichkurven war vor allem der Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen Peakfläche und eingespritzter Substanzmenge von Bedeutung. Da die Peakbreiten innerhalb eines Meßbereiches relativ konstant sind, läßt sich ein derartiger Zusammenhang eventuell sogar zwischen Peakhöhe und Substanzmenge zeigen, was die Auswertung noch vereinfacht.

Die Messung wurde auf allen sinnvoll erscheinenden Meßbereichen des Gerätes ausgeführt und auf diese Weise auch die ungefähre Nachweisgrenze der Substanzen im empfindlichsten

Meßbereich sowie die eventuell bei hohen Konzentrationen auftretenden Grenzen der Linearität in Erfahrung gebracht.

Zu den Nachweisgrenzen sei noch bemerkt, daß sie außer von der aktuellen Empfindlichkeit des Detektors vor allem von der Konstanz der Nulllinie abhängen. Bei einer ruhigen Nulllinie ohne Störpeaks ist der Nachweis viel empfindlicher als bei starken Grundschwankungen, wo ein kleiner Ausschlag nie als signifikanter Peak gewertet werden kann. Die Empfindlichkeit könnte durch Eliminieren eingeschleppter Störsubstanzen und damit Störpeaks noch erheblich gesteigert werden. Allgemein müssen die verwendeten Geräte von störenden Umwelteinflüssen möglichst gut abgeschirmt werden.

Bei der Auswertung der gaschromatographischen Meßergebnisse wurden die Peakflächen, wie bereits beschrieben, näherungsweise als Produkt aus Peakhöhe und Peakbreite auf halber Peakhöhe berechnet. Für die erhaltenen Wertepaare (x_i, y) mit x = Peakfläche (bzw. Peakhöhe) und y = Substanzmenge wurden Kurvenanpassungen durchgeführt. Dazu wurden folgende Formeln zur Berechnung einer linearen Regression und zur Anpassung einer Potenzfunktion verwendet (Claus, G. und Ebner, H., 1975).

Lineare Regression $y = a + b \cdot x$

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$a = \left[\frac{\sum y_i}{n} - b \frac{\sum x_i}{n} \right]$$

$$r^2 = \frac{\left[\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right]}$$

Anpassung einer Potenzfunktion $y = \hat{a}x^b$
mit $x_i, y_i > 0$

$$b = \frac{\sum (\ln x_i)(\ln y_i) - \frac{(\sum \ln x_i)(\sum \ln y_i)}{n}}{\sum (\ln x_i)^2 - \frac{(\sum \ln x_i)^2}{n}}$$

$$a = \exp \left[\frac{\sum \ln y_i}{n} - b \frac{\sum \ln x_i}{n} \right]$$

$$r^2 = \frac{\left[\sum (\ln x_i)(\ln y_i) - \frac{(\sum \ln x_i)(\sum \ln y_i)}{n} \right]^2}{\left[\sum (\ln x_i)^2 - \frac{(\sum \ln x_i)^2}{n} \right] \left[\sum (\ln y_i)^2 - \frac{(\sum \ln y_i)^2}{n} \right]}$$

a und b sind die empirischen Regressionskoeffizienten der Regression von y auf x. r gibt den empirischen Korrelationskoeffizienten, r^2 das Bestimmtheitsmaß an. Dabei liefert r^2 gleichsam eine Aussage über die Güte der durch die Regressionskurve angegebenen Beschreibung der vorhandenen Daten, d.h. je größer r^2 (mit $0 < r^2 < 1$), desto "besser" ist die Beschreibung. Diese Auswertung wurde in der Regel auf einen Meßbereich bezogen, da beim Übergang in einen anderen die Linearität wegen des möglichen Elektrometerfehlers nicht mit Sicherheit gegeben war. Für die Auswertung späterer Messungen spielt es keine Rolle, ob mit einer einzigen oder mit einer für den jeweiligen Meßbereich gültigen Eichgeradengleichung gerechnet wird, daher konnte diese Fehlerquelle ausgeschaltet werden.

2.1. Eichkurven für methyliertes Dimethylphosphat (mDMP) bzw. Trimethylphosphat (TMP)

2.1.1. Herstellung der Dimethylphosphat-Standardlösung

127 mg DMP-NH_4^+ -Salz (90 %ig) werden in ein 10 ml-Meßkölbchen eingewogen und mit Methanol auf exakt 10 ml aufgefüllt. Man erhält eine Stammlösung mit der Konzentration 10 mg/ml.

Durch Verdünnen mit Methanol werden Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- | | | |
|-----|-----------|-----------------|
| (1) | 10 mg/ml | DMP in Methanol |
| (2) | 1 mg/ml | DMP in Methanol |
| (3) | 100 µg/ml | DMP in Methanol |
| (4) | 10 µg/ml | DMP in Methanol |
| (5) | 1 µg/ml | DMP in Methanol |

2.1.2. Methylierung der Standardlösungen

Mit einer Kolbenhubpipette werden 100 µl der DMP-Standardlösung in ein auf 0,5 und 1 ml graduiertes, verschließbares Probenfläschchen für die Gaschromatographie überführt, mit 10 µl entsprechend 1 Tropfen HCl konz. angesäuert und Diazomethanreagens bis zur bleibenden Gelbfärbung zugegeben. In unserer Versuchsserie wurden pro Ansatz ca. 1,3 ml Reagens benötigt. Man läßt den Ansatz 30 min im Abzug stehen und zerstört dann den Reagensüberschuß mit 10 µl = 1 Tropfen HCOOH (98 %ig). Unter sanftem N₂-Strom wird das Ansatzvolumen, das bei Reaktionsende etwas mehr als 1 ml beträgt, auf genau 0,5 ml eingeeengt und das Probenfläschchen dicht verschlossen.

Zur Einleitung des N₂-Stromes hat es sich bewährt, an die N₂-Leitung eine Pasteur-Pipette oder eine ausgezogene Glasspitze anzuschließen.

Unter Berücksichtigung der im Verlauf der Methylierung erfolgten Verdünnung um den Faktor 5 erhält man folgende Standardlösungen:

- (1) 2 mg/ml DMP (methyliert)
- (2) 200 µg/ml DMP (methyliert)
- (3) 20 µg/ml DMP (methyliert)
- (4) 2 µg/ml DMP (methyliert)
- (5) 200 ng/ml DMP (methyliert)

Dabei bezieht sich die Konzentrationsangabe auf das eingesetzte DMP, nicht auf das Reaktionsprodukt mDMP-TMP, was im Hinblick auf die spätere Auswertung von Analysen mittels Eichkurve das Zurückrechnen auf die im Untersuchungsansatz enthaltene Menge DMP erleichtert.

Aus den Molgewichten ergibt sich für die Umrechnung von DMP- in TMP-Konzentrationsangaben der Rechenfaktor 1,1.

2.1.3. Herstellung der Trimethylphosphat-Standardlösungen

100 mg TMP (purum für GC) werden in ein 10 ml-Meßkölbchen eingewogen und mit Benzol auf exakt 10 ml aufgefüllt. Man erhält eine Stammlösung mit der Konzentration 10 mg/ml. Durch Verdünnung mit Benzol werden Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- 10 mg/ml TMP in Benzol
- 1 mg/ml TMP in Benzol
- 500 µg/ml TMP in Benzol
- 200 µg/ml TMP in Benzol
- 100 µg/ml TMP in Benzol
- 50 µg/ml TMP in Benzol
- 20 µg/ml TMP in Benzol
- 10 µg/ml TMP in Benzol
- 1 µg/ml TMP in Benzol
- 500 ng/ml TMP in Benzol
- 100 ng/ml TMP in Benzol

2.1.4. Vergleich von methyliertem DMP-Standard und TMP-Standard

Nach Shafik und Enos (1969) verläuft unter den angegebenen Versuchsbedingungen die Methylierung von DMP, gemessen im Vergleich mit einem TMP-Standard, praktisch quantitativ. Dazu führten wir einen Kontrollversuch durch, dessen Ergebnisse in Tab. 4 aufgelistet sind.

Tabelle 4: Ergebnisse eines Kontrollversuches zur Ausbeutenbestimmung bei der Methylierung von DMP

Meßbereich	Substanzmenge DMP	Vergleichsmenge TMP	Peakfläche mDMP (mm ²)	Peakfläche TMP (mm ²)	%
10 ³ /4	200 pg	220,0 pg	5,0	4,5	111,1
10 ³ /4	2 ng	2,2 ng	36,0	42,0	85,7
10 ⁴ /4	20 ng	22,0 ng	66,0	64,0	103,1
10 ⁵ /4	200 ng	220,0 ng	103,0	108,0	95,4
					98,8

Die %-Angaben in Tabelle 4 beziehen sich auf das Reaktionsprodukt TMP aus der Methylierung von DMP im Vergleich zum TMP-Standard, der jeweils = 100 % gesetzt wurde. Aus 4 Messungen ergibt sich ein Mittelwert von 98,8 %, d.h. die Methylierung verläuft praktisch quantitativ.

Damit erübrigt sich die Erstellung einer Eichkurve für methyliertes DMP, ausgehend von DMP-Standardlösungen. Für die Auswertung späterer Messungen kann eine Eichkurve ausgehend von TMP-Standardlösungen zugrunde gelegt werden.

Die relativ geringe Präzision der Messungen ist durch die große Zahl an möglichen Fehlerquellen bedingt, z.B. durch Einwaage-, Pipettier- und Verdünnungsfehler beim Herstellen der Standardlösungen, durch mangelnde exakte Reproduzierbarkeit der Einspritzmengen etc.

2.1.5. Ergebnisse der gaschromatographischen Messungen

Als Beispiel für die Erstellung einer Tageseichkurve sind in den folgenden Tabellen die durch Auswertung einer gaschromatographischen Reihenmessung der oben aufgeführten Standardlösungen erhaltenen Peakhöhen und Peakflächen in Abhängigkeit von der eingespritzten Substanzmenge aufgelistet (Tab. 5) und für diese Wertepaare eine Kurvenanpassung nach den auf S. 49 f beschriebenen Formeln durchgeführt (Tab. 6).

In den Abbildungen 3, 4, 5 und 6 sind die Ergebnisse dieser Meßreihe für die einzelnen Meßbereiche graphisch dargestellt.

Tabelle 5: Wertetabelle zur Erstellung einer
Tageseichkurve für TMP

Substanzmenge TMP	Peakhöhe (mm ²)	Peakfläche (mm ²)
Meßbereich Range 10 ³ /Attenuation 2		
100,0 pg	5,5	6,875
200,0 pg	9,5	14,25
300,0 pg	13,5	20,25
400,0 pg	18,0	27,0
500,0 pg	19,5	29,25
600,0 pg	25,0	37,5
700,0 pg	29,0	43,5
800,0 pg	30,0	52,5
900,0 pg	36,0	63,0
1,0 ng	47,0	82,25
1,5 µg	69,0	120,75
2,0 µg	96,0	168,0
2,5 µg	115,0	201,25
3,0 µg	131,0	262,0
4,0 µg	194,0	388,0

Substanzmenge TMP	Peakhöhe (mm ²)	Peakfläche (mm ²)
-------------------	--------------------------------	----------------------------------

Range 10³/Attenuation 4

100,0 pg	3,0	4,5
250,0 pg	7,0	10,5
500,0 pg	10,5	18,375
750,0 pg	15,0	26,25
1,0 ng	24,0	42,0
1,5 ng	30,0	60,0
2,0 ng	47,5	95,0
3,0 ng	61,0	122,0
4,0 ng	91,0	182,0
6,0 ng	148,5	297,0
7,5 ng	190,5	381,0

Range 10⁴/Attenuation 4

5,0 ng	14,5	18,125
7,0 ng	19,5	24,375
10,0 ng	30,0	37,5
15,0 ng	37,5	56,25
20,0 ng	49,0	73,5
30,0 ng	81,0	141,75
40,0 ng	118,5	207,375
50,0 ng	152,0	266,0
60,0 ng	155,0	310,0
70,0 ng	192,0	384,0

Substanzmenge TMP	Peakhöhe (mm ²)	Peakfläche (mm ²)
-------------------	--------------------------------	----------------------------------

Range 10⁵/Attenuation 4

20,0 ng	5,0	6,25
50,0 ng	15,0	18,75
75,0 ng	22,5	28,125
100,0 ng	34,0	42,5
150,0 ng	44,0	66,0
200,0 ng	60,0	90,0
300,0 ng	83,0	124,5
400,0 ng	98,5	172,375
500,0 ng	112,0	196,0
500,0 ng	116,0	203,0
600,0 ng	116,0	203,0
750,0 ng	140,5	245,875
900,0 ng	141,5	247,625
1,0 µg	145,0	253,75
1,5 µg	154,0	308,0
2,0 µg	160,5	321,0
5,0 µg	171,0	384,75
10,0 µg	182,0	409,5

Tabelle 6: Kurvenanpassung für die Wertepaare
aus Tab. 5

Lineare Regression: $y = a + bx$

für x = Peakhöhe

Meßbereich	r^2	a	b
Range 10^3 /Att.2	0,9948	0,0637	0,0209
Range 10^3 /Att.4	0,9936	0,1552	0,0396
Range 10^4 /Att.4	0,9884	0,3960	0,3569
Range 10^5 /Att.4	0,9834	-0,0168	0,0039
für TMP 500 ng			

für x = Peakfläche

Meßbereich	r^2	a	b
Range 10^3 /Att.2	0,9901	0,1776	0,0104
Range 10^3 /Att.4	0,9946	0,2068	0,0196
Range 10^4 /Att.4	0,9951	4,0552	0,1754
Range 10^5 /Att.4	0,9975	0,0047	0,0023
für TMP 500 ng			

Abbildung 3:

Beispiel einer Tageseichgerade für TMP

Meßbereich: Range 10^3 /Attenuation 2

für Substanzmengen bis ca. 4 ng

$$y = 0,1776 + 0,0104 x$$

mit x = Peakfläche in mm^2

y = Substanzmenge in ng

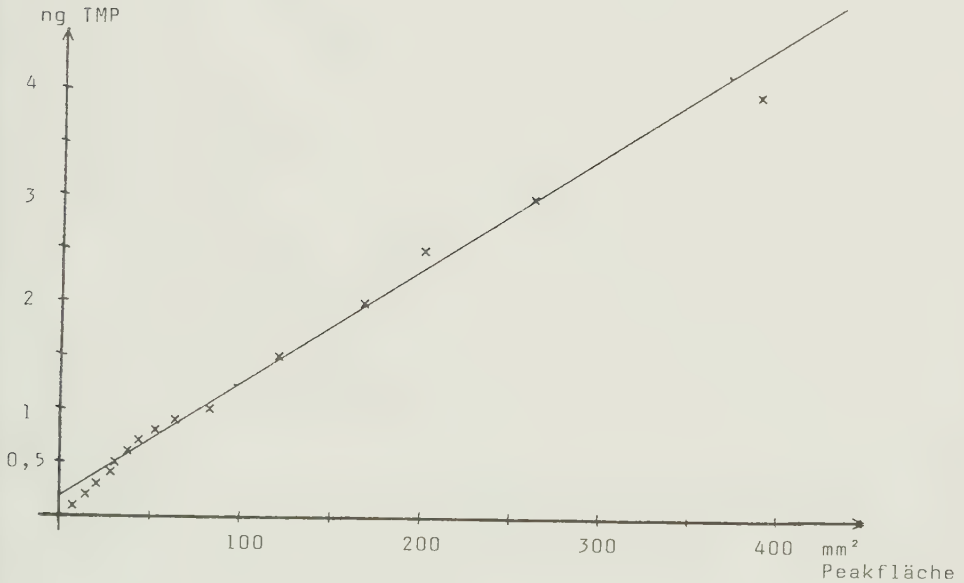


Abbildung 4:

Beispiel einer Tageseichgerade für TMP

Meßbereich: Range 10^3 /Attenuation 4

für Substanzmengen bis ca. 7,5 ng

$$y = 0,2068 + 0,0196 x$$

mit x = Peakfläche in mm^2

y = Substanzmenge in ng

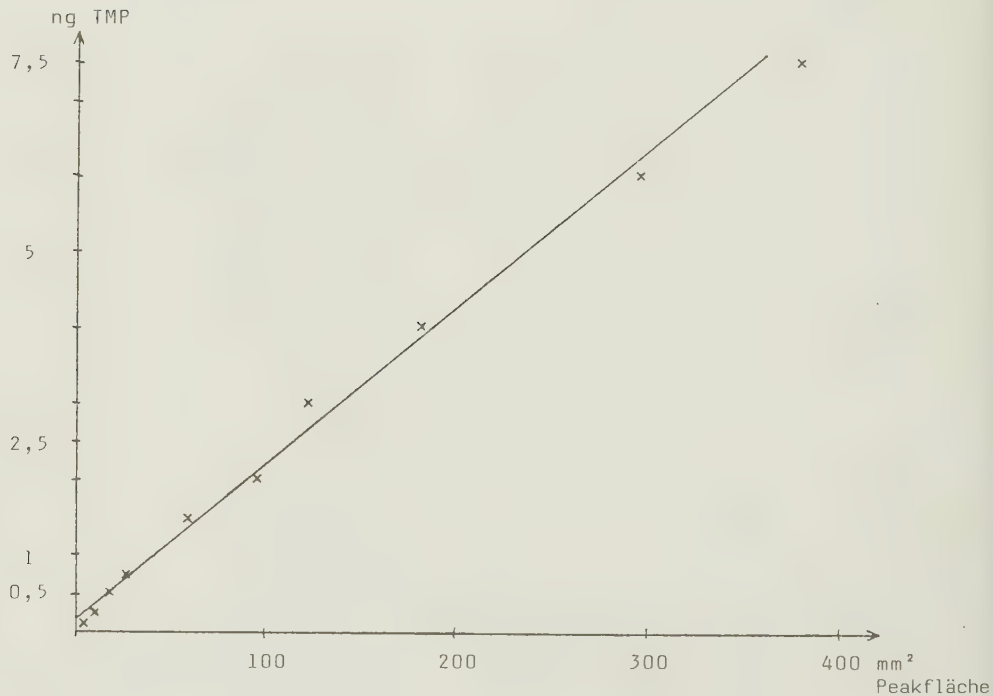


Abbildung 5:

Beispiel einer Tageseichgerade für TMP

Meßbereich: Range 10^4 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 5 - 70 ng

$$y = 4,0552 + 0,1754 x$$

mit x = Peakfläche in mm^2

y = Substanzmenge in ng

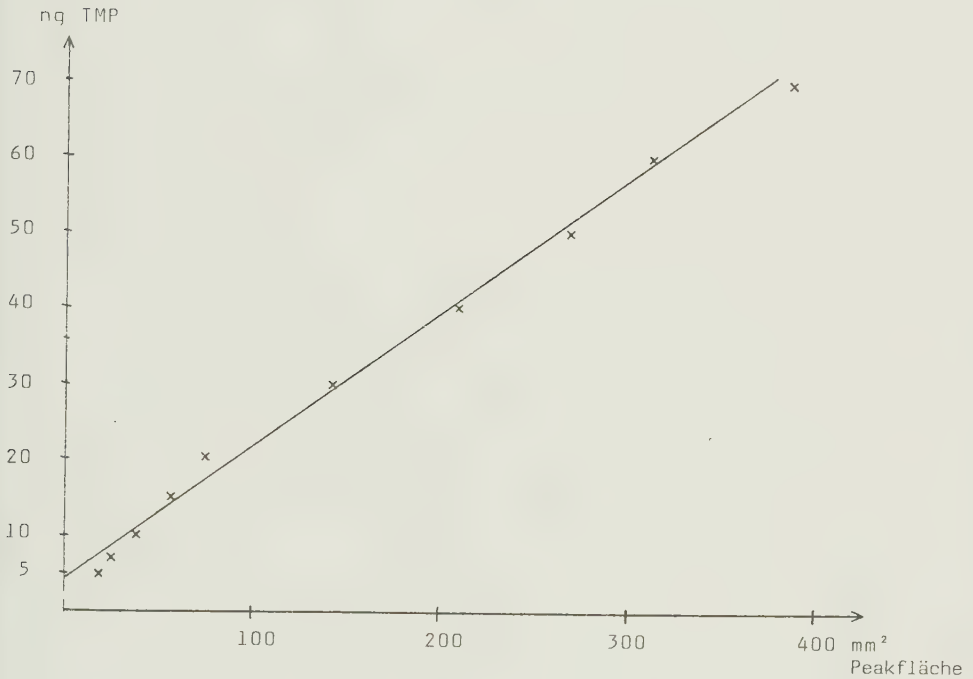


Abbildung 6:

Beispiel einer Tageseichgerade für TMP

Meßbereich: Range 10^5 /Attenuation 4

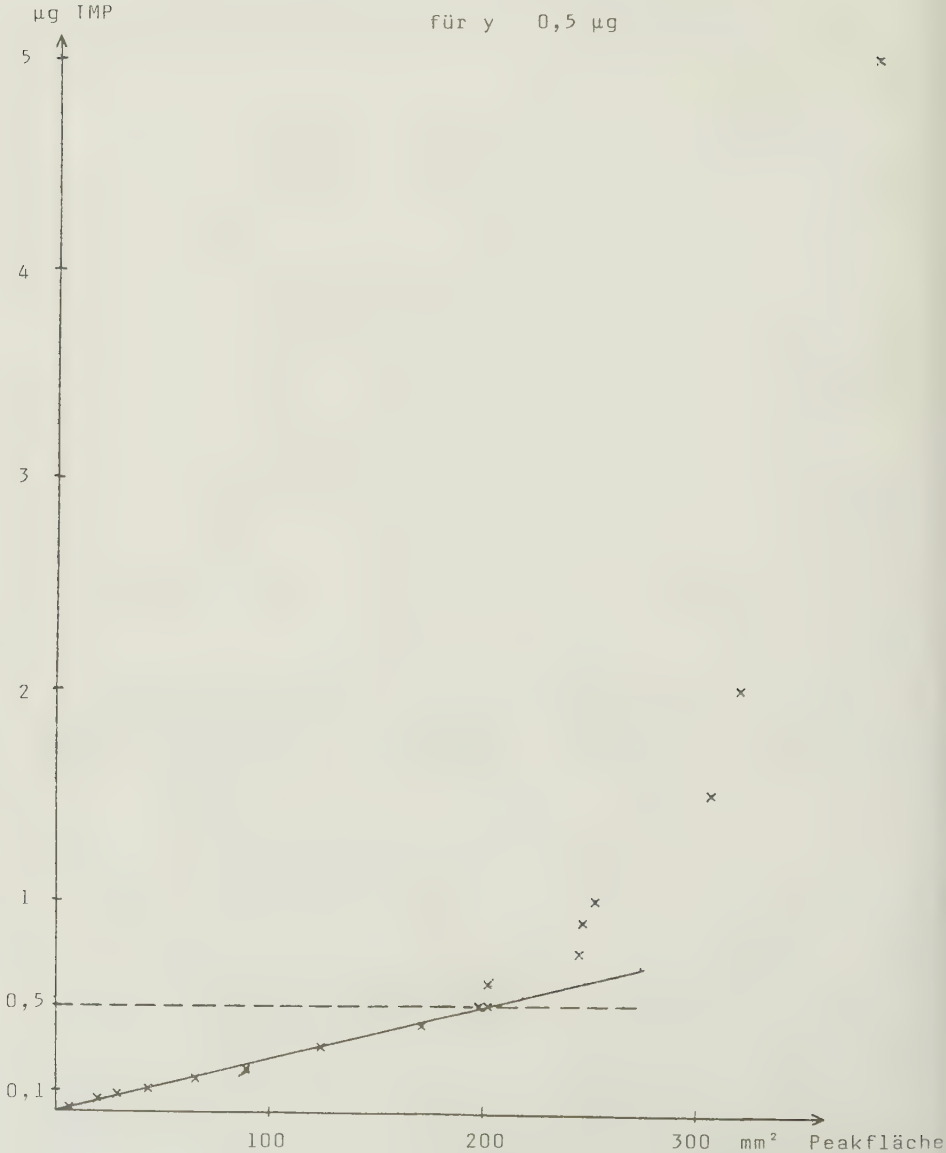
für Substanzmengen von 0,02 - 0,5 μg

$$y = 0,0047 + 0,0023 x$$

mit x = Peakfläche in mm^2

y = Substanzmenge in μg

für y 0,5 μg



2.1.6. Linearität

Ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Substanzmenge sowie zwischen Peakhöhe und Substanzmenge besteht für alle Meßbereiche bei eingespritzten Substanzmengen bis zu 500 ng. Bei größeren Substanzmengen an TMP ist keine Linearität mehr gewährleistet. Die Erstellung einer den Wertepaaren gut angepaßten nichtlinearen Eichkurve erscheint in diesem Bereich nicht sinnvoll. Bei entsprechend hohen Konzentrationen im Ansatz muß also verdünnt werden. Dadurch sind jederzeit Werte erreichbar, die im linearen Bereich liegen (s. Abb. 6).

2.1.7. Nachweisgrenzen

Sowohl bei Einspritzung von 1 µl des Ansatzes mit 200 ng/ml DMP (methyliert) als auch der Standardlösung mit 100 ng/ml TMP in Benzol erschien ein signifikanter Peak. Das entspricht einer Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml bezogen auf die Konzentration von TMP in der eingespritzten Lösung. Bezogen auf die bei der gaschromatographischen Messung eingesetzte absolute Menge an TMP liegt die Nachweisgrenze bei ca. 0,1 ng TMP.

2.2. Eichkurven für ethyliertes Dimethylphosphat (eDMP)

2.2.1. Herstellung der DMP-Standardlösung

127 mg DMP-NH₄⁺-Salz (90 %ig) werden in ein 10 ml-Meßkölbchen eingewogen und mit Ethanol auf exakt 10 ml aufgefüllt. Man erhält eine Stammlösung der Konzentration 10 mg/ml. Durch Verdünnung mit Ethanol

werden Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- (1) 10 mg/ml DMP in Ethanol
- (2) 1 mg/ml DMP in Ethanol
- (3) 100 µg/ml DMP in Ethanol
- (4) 10 µg/ml DMP in Ethanol
- (5) 1 µg/ml DMP in Ethanol

2.2.2. Ethylierung der Standardlösung

Die Ethylierung erfolgt analog der Methylierung (s.S. 51) unter Verwendung von Diazoethan-Reagens anstelle von Diazomethan-Reagens.

Unter Berücksichtigung der im Verlauf der Ethylierung erfolgten Verdünnung um den Faktor 10 erhält man folgende Standardlösungen (die Konzentrationsangaben beziehen sich wieder auf das eingesetzte DMP, nicht auf das Reaktionsprodukt Monoethyl-dimethylphosphat):

- (1) 1 mg/ml DMP (ethyliert)
- (2) 100 µg/ml DMP (ethyliert)
- (3) 10 µg/ml DMP (ethyliert)
- (4) 1 µg/ml DMP (ethyliert)
- (5) 100 ng/ml DMP (ethyliert)

Da bei der Messung im niederen Konzentrationsbereich auf Range 10^3 /Att. 4 unter Verwendung von Ansatz (5) starke Störpeaks auftraten, die eine Auswertung unmöglich machten, wurden die Messungen auf Range 10^3 /Att. 4 mit folgenden Verdünnungen aus Ansatz 2 (100 µg/ml DMP ethyliert) wiederholt und ausgewertet:

(2) 100 µg/ml DMP ethyliert

(3a) 10 µg/ml DMP ethyliert

(4a) 1 µg/ml DMP ethyliert

(5a) 100 ng/ml DMP ethyliert

(6a) 10 ng/ml DMP ethyliert

2.2.3. Ergebnisse der gaschromatographischen Messung

Ausgehend von den o.g. Standardlösungen von DMP wurde eine Tageseichkurve erstellt. Die folgenden Tabellen zeigen die durch die Auswertung der gaschromatographischen Messung erhaltenen Peakhöhen und Peakflächen in Abhängigkeit von der eingespritzten Substanzmenge (Tab. 7) und die für diese Wertepaare durchgeführte Kurvenanpassung (Tab. 8).

In Abbildung 7, 8 und 9 sind die Ergebnisse dieser Meßreihe für die einzelnen Meßbereiche graphisch dargestellt.

Tabelle 7: Wertetabelle zur Erstellung einer
Tageseichkurve für ethyliertes DMP

Substanzmenge	Peakhöhe (mm)	Peakfläche (mm ²)
Meßbereich Range 10 ³ /Attenuation 4		
20 pg	1,0	1,0
30 pg	1,5	1,5
40 pg	2,0	2,0
50 pg	2,5	2,5
50 pg	2,0	2,0
100 pg	3,5	4,375
200 pg	6,0	9,0
300 pg	9,0	13,5
400 pg	12,0	18,0
500 pg	15,0	22,5
500 pg	16,0	24,0
1 ng	30,0	45,0
2 ng	49,0	85,75
3 ng	71,0	124,25
4 ng	98,5	172,375
5 ng	124,0	217,0
7 ng	191,5	335,125

Substanzmenge Peakhöhe Peakfläche

Meßbereich Range 10^4 /Attenuation 4

5 ng	20,0	30,0
10 ng	38,5	57,75
20 ng	81,0	121,5
30 ng	110,0	192,5
40 ng	155,0	271,25
50 ng	195,0	341,25
40 ng	160,0	280,0
50 ng	208,0	364,0

Meßbereich Range 10^5 /Attenuation 4

100 ng	42,0	63,0
200 ng	75,5	132,125
300 ng	107,0	214,0
400 ng	134,5	269,0
500 ng	153,5	345,375
600 ng	172,0	387,0
500 ng	169,5	381,375
2 µg	228,0	513,0

Tabelle 8: Kurvenanpassung für die Wertepaare
aus Tab. 7

Lineare Regression: $y = a + bx$

für $x = \text{Peakhöhe}$

Meßbereich	r^2	a	b
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9947	- 0,0146	0,0385
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9943	0,6969	0,2475
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9981	-39,8944	3,2300
für eDMP 500 ng			

für $x = \text{Peakfläche}$

Meßbereich	r^2	a	b
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9957	0,0338	0,0218
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9947	2,3275	0,1365
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9948	9,0324	1,4214
für eDMP 500 ng			

Abbildung 7:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMP

Meßbereich: Range 10^3 /Attenuation 4

für Substanzmengen bis ca. 7 ng

$$y = 0,0338 + 0,0218 x \quad \text{mit } x = \text{Peakfläche in mm}^2$$
$$y = \text{Substanzmenge in ng}$$

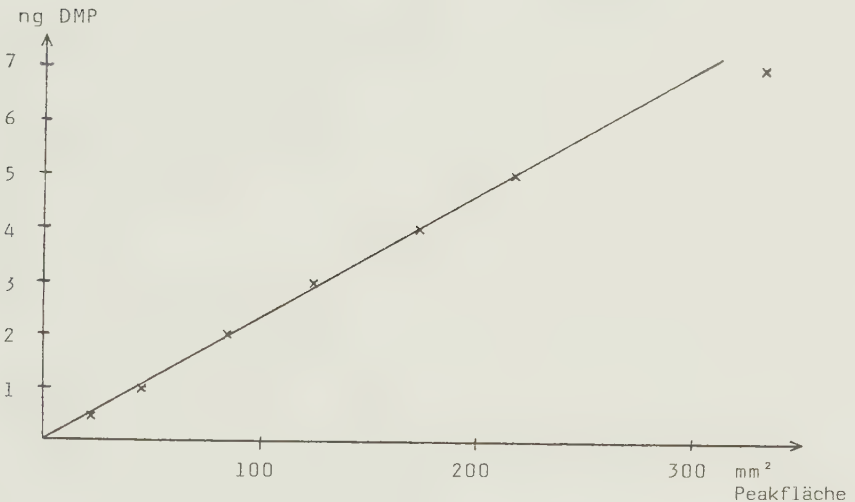


Abbildung 8:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMP

Meßbereich: Range 10^4 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 5 - 50 ng

$$y = 2,3275 + 0,1365 x \quad \text{mit } x = \text{Peakfläche in mm}^2$$
$$y = \text{Substanzmenge in ng}$$

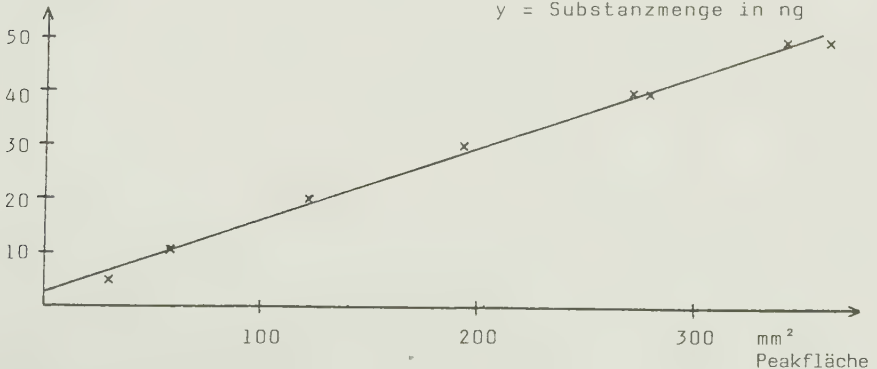


Abbildung 9:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMP

Meßbereich: Range 10^5 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 0,1 - 0,5 μg

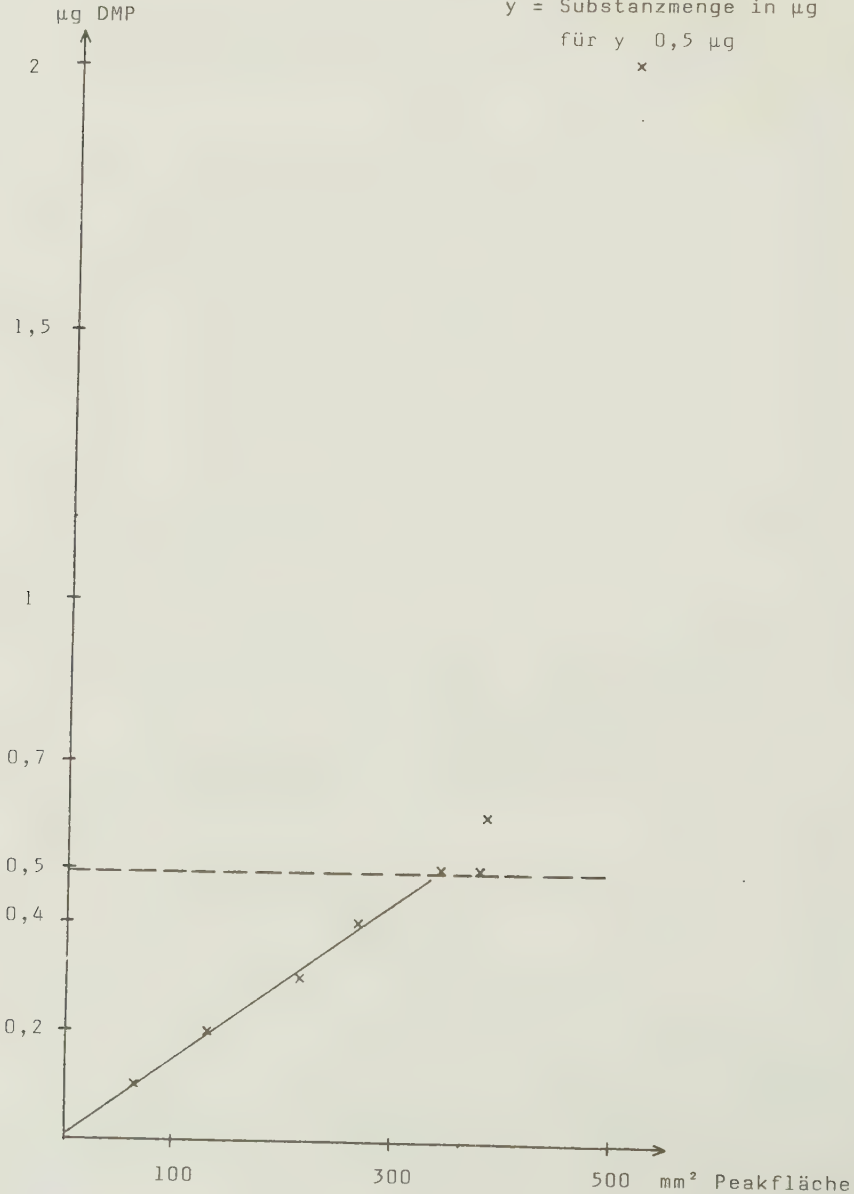
$$y = 9,0324 + 1,4214 x$$

mit x = Peakfläche in mm^2

y = Substanzmenge in μg

für y 0,5 μg

x



2.2.4. Linearität

Ein linearer Zusammenhang zwischen Peakhöhe und Substanzmenge sowie zwischen Peakfläche und Substanzmenge besteht bei allen Meßbereichen für eingespritzte Substanzmengen bis zu 500 ng. Bei größeren Substanzmengen an ethyliertem DMP ist keine Linearität mehr gewährleistet. Die Erstellung einer den Wertepaaren gut angepaßten nichtlinearen Eichkurve ist in diesem Bereich nicht möglich. Es muß also bei entsprechend hohen Konzentrationen im Ansatz verdünnt werden, bis die Werte im linearen Bereich liegen (s. Abb. 9).

2.2.5. Nachweisgrenze

Im empfindlichsten Meßbereich Range 10^3 /Attenuation 4 trat bei Einspritzung von 2 µl Ansatz (6a) mit 10 ng/ml ein eindeutiger Peak auf, bei 1 µl Ansatz (6a) mit 10 ng/ml konnte der Peak wegen Schwankungen der Nulllinie nicht mehr als signifikant betrachtet werden (s.S. 64 f). Die Nachweisgrenze für DMP (ethyliert) liegt demnach bei einer Konzentration von ca. 0,020 µg/ml im gaschromatographisch untersuchten Ansatz.

Bezieht man die Nachweisgrenze auf die tatsächlich in die gaschromatographische Messung eingebrachte Substanzmenge, so liegt sie entsprechend der oben durchgeführten Abschätzung bei ca. 0,02 ng DMP (ethyliert).

2.3. Eichkurven für methyliertes Dimethylthiophosphat (mDMTP)

2.3.1. Herstellung der Dimethylthiophosphat-Standardlösung

124 mg DMTP-NH₄⁺-Salz (90 %ig) werden in ein 10 ml-Meßkölbchen eingewogen und mit Methanol auf exakt 10 ml aufgefüllt. Man erhält eine Stammlösung der Konzentration 10 mg DMTP/ml. Durch Verdünnung mit Methanol werden Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- (1) 10 mg/ml DMTP in Methanol
- (2) 1 mg/ml DMTP in Methanol
- (3) 100 µg/ml DMTP in Methanol
- (4) 10 µg/ml DMTP in Methanol
- (5) 1 µg/ml DMTP in Methanol

2.3.2. Methylierung der Standardlösung

Die Methylierung wird wie bei der Erstellung der mDMP-Eichkurve beschrieben durchgeführt (s.S. 51). Man erhält folgende Standardlösungen, wobei sich die Konzentrationsangaben auf das eingesetzte DMTP, nicht auf dessen Reaktionsprodukte beziehen:

- (1) 1 mg/ml DMTP (methyliert)
- (2) 100 µg/ml DMTP (methyliert)
- (3) 10 µg/ml DMTP (methyliert)
- (4) 1 µg/ml DMTP (methyliert)
- (5) 100 ng/ml DMTP (methyliert)

2.3.3. Ergebnisse der gaschromatographischen Messung

Ausgehend von den methylierten Standardlösungen wurde eine Tageseichkurve erstellt. Die folgenden Tabellen zeigen die bei der gaschromatographischen Messung erhaltenen Peakhöhen und Peakflächen in Abhängigkeit von der eingespritzten Substanzmenge (Tab. 9) und die für diese Werte durchgeführte Kurvenanpassung (Tab. 10).

In den Abbildungen 10, 11 und 12 sind die Ergebnisse dieser Meßreihe für die einzelnen Meßbereiche graphisch dargestellt.

Tabelle 9: Wertetabelle zur Erstellung einer
Tageseichkurve für methyliertes DMTP
("t_{ret}" = Retentionszeit)

Substanzmenge DMTP	Peak mit t _{ret} = 3'07"		Peak mit t _{ret} = 11'34"		Σ
	Peakhöhe (mm)	Peakfläche (mm ²)	Peakhöhe (mm)	Peakfläche (mm ²)	Peakfläche (mm ²)

Meßbereich Range 10³/Attenuation 4

1,0 ng	6	1,5	0,5	0,75	2,25
2,0 ng	5	1,25	1,0	1,5	2,75
5,0 ng	15	3,75	2,5	5,0	8,75
10,0 ng	50	25,0	7,0	14,0	39,0
15,0 ng	70	35,0	12,5	28,125	63,125
20,0 ng	68	34,0	15,0	37,5	71,5
30,0 ng	110	55,0	22,5	56,25	111,25
50,0 ng	190	95,0	52,0	143,0	238,0

Meßbereich Range 10⁴/Attenuation 4

50,0 ng	45	45,0	9,0	22,5	67,5
100,0 ng	65	65,0	16,0	44,0	109,0
150,0 ng	90	90,0	27,0	81,0	171,0
200,0 ng	131	131,0	46,0	138,0	269,0
250,0 ng	157	157,0	62,0	201,5	358,5
300,0 ng	192	192,0	78,0	253,5	445,5

Meßbereich Range 10⁵/Attenuation 4

350,0 ng	23	23,0	10,0	27,5	50,5
400,0 ng	25	31,25	12,5	37,5	68,75
600,0 ng	53	53,0	33,5	92,125	145,125
1,0 µg	91	113,75	65,0	195,0	308,75
2,5 µg	150	225,0	115,0	402,5	627,5
4,0 µg	172	258,0	147,0	588,0	846,0

Tabelle 10: Kurvenanpassung für die Wertepaare
aus Tab. 9

Lineare Regression: $y = a + bx$

Meßbereich	r^2	a	b
für x = Peakfläche bei $t_{ret} = 3'07''$			
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9810	0,5437	0,5136
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9968	-11,7898	1,6481
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9956	0,1902	0,0072
für x = Peakfläche bei $t_{ret} = 11'34''$			
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9569	4,3536	0,3431
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9763	49,8273	1,0142
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9997	0,2487	0,0038
für x = Peakflächensumme			
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9815	2,6141	0,2089
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9839	26,0356	0,6292
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9997	0,2278	0,0025
für DMTP 1 μg			

Abbildung 10:

Beispiel einer Tageseichgerade für methyliertes DMTP

Meßbereich: Range 10^3 /Attenuation 4

für Substanzmengen bis ca. 50 ng

$$y = 2,6141 + 0,2089 x$$

mit x = Peakflächensumme in mm^2

y = Substanzmenge in ng

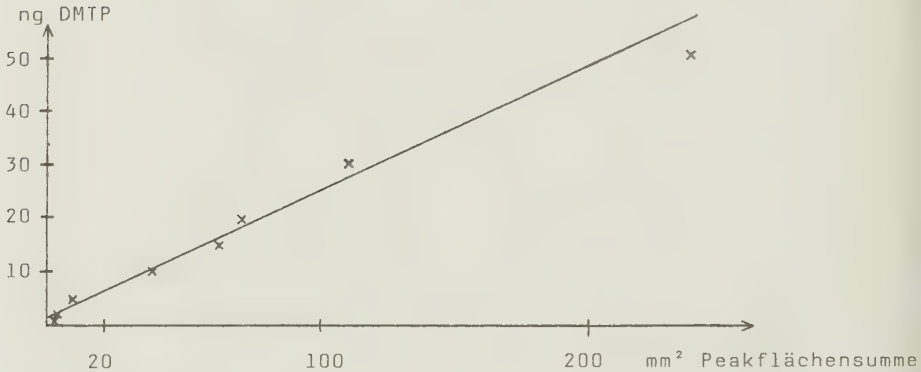


Abbildung 11:

Beispiel einer Tageseichgerade für methyliertes DMTP

Meßbereich: Range 10^4 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 50 - 300 ng

$$y = 26,0356 + 0,6292 x$$

mit x = Peakflächensumme in mm^2

y = Substanzmenge in ng

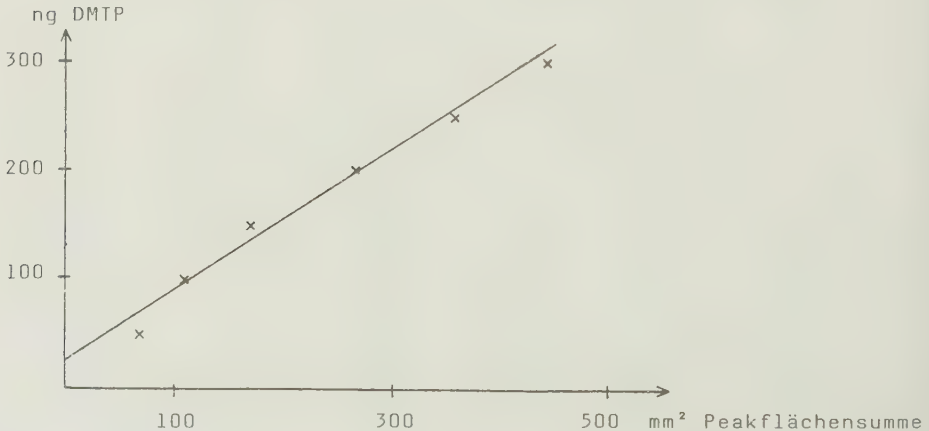


Abbildung 12:

Beispiel einer Tageseichgerade für methyliertes DMTP

Meßbereich: Range 10^5 /Attenuation 4

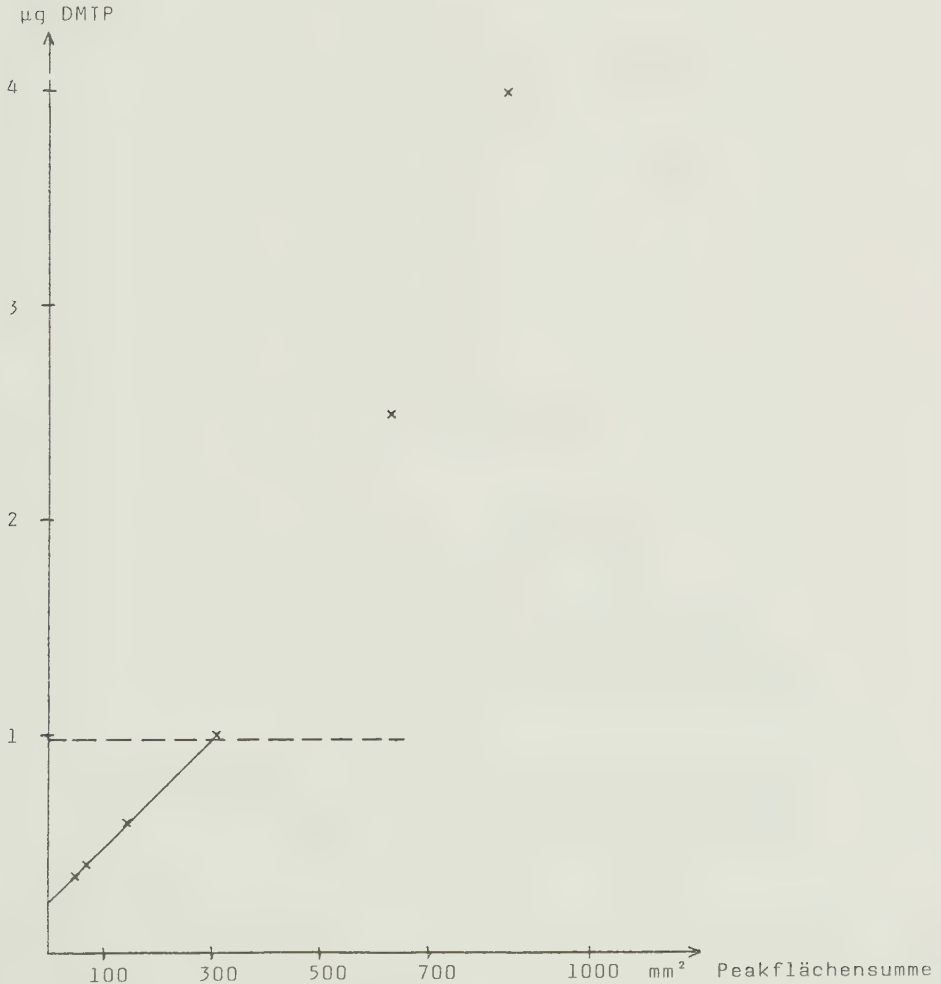
für Substanzmengen von ca. 0,3 - 1 µg

$$y = 0,2278 + 0,0025 x$$

für x = Peakflächensumme in mm^2

y = Substanzmenge in µg

für y 1 µg



2.3.4. Linearität

Die Aufstellung der Eichkurven wurde durch die Tatsache kompliziert, daß bei der Methylierung von DMTP zwei Reaktionsprodukte auftreten, deren prozentuale Verteilung von den Reaktionsbedingungen abhängen (vgl. S. 28 f).

Es wurden Peakflächen und Peakhöhen der einzelnen Reaktionsprodukte sowie die Summe beider Peakflächen ausgewertet und zur eingespritzten Menge DMTP in Beziehung gesetzt. Dabei zeigte sich Linearität für Substanzmengen $< 1 \mu\text{g}$ DMTP sowohl für die Peakflächensumme als auch bei Betrachtung der Einzelpeaks. Es ist jedoch zu beachten, daß bei Erstellung der Eichkurven die Reaktionsbedingungen relativ konstant waren, so daß bezüglich der prozentualen Verteilung beider Reaktionsprodukte keine großen Schwankungen auftraten. Dies ist bei normalen Messungen nicht immer der Fall. Daher sollte in der Praxis die Eichkurve für die Summe beider Peakflächen benutzt werden (s. Abb. 12).

2.3.5. Nachweisgrenze

Signifikante Peaks traten bei der Einspritzung von $1 \mu\text{l}$ des Ansatzes (4) mit $1 \mu\text{g/ml}$ DMTP (methyliert) auf, d.h. die Nachweisgrenze für DMTP (methyliert) liegt bei einer Konzentration von ca. $1 \mu\text{g/ml}$ im Ansatz.

Die Nachweisgrenze für die absolute Substanzmenge bei der gaschromatographischen Messung liegt nach dieser Abschätzung bei ca. 1 ng DMTP (methyliert).

2.4. Eichkurven für ethyliertes Dimethylthiophosphat (eDMTP)

2.4.1. Herstellung der Dimethylthiophosphat-Standardlösungen

127 mg DMTP-NH₄⁺-Salz (90 %ig) werden in ein 10 ml-Meßkölbchen eingewogen und mit Ethanol auf exakt 10 ml aufgefüllt. Man erhält eine Stammlösung der Konzentration 10 mg DMTP/ml. Durch Verdünnung mit Ethanol werden Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- (1) 10 mg/ml DMTP in Ethanol
- (2) 1 mg/ml DMTP in Ethanol
- (3) 100 µg/ml DMTP in Ethanol
- (4) 10 µg/ml DMTP in Ethanol
- (5) 1 µg/ml DMTP in Ethanol

2.4.2. Ethylierung der Standardlösungen

Die Ethylierung wird analog der Methylierung (s.S.51) unter Verwendung von Diazoethan-Reagens anstelle von Diazomethan-Reagens durchgeführt. Man erhält folgende Standardlösungen, wobei sich die Konzentrationsangaben auf das eingesetzte DMTP, nicht auf dessen Reaktionsprodukte beziehen:

- (1) 1 mg/ml DMTP (ethyliert)
- (2) 100 µg/ml DMTP (ethyliert)
- (3) 10 µg/ml DMTP (ethyliert)
- (4) 1 µg/ml DMTP (ethyliert)
- (5) 100 ng/ml DMTP (ethyliert)

Da bei der gaschromatographischen Messung im niederen Konzentrationsbereich auf Range 10^3 /Attenuation 4 unter Verwendung von Ansatz (5) (100 ng/ml eDMTP) starke Störpeaks auftraten, die eine Auswertung unmöglich machten, wurden die Messungen auf Range 10^3 /Att. 4 mit folgenden Verdünnungen aus Ansatz (1) (1 mg/ml eDMTP) wiederholt und ausgewertet:

(1) 1 mg/ml DMTP (ethyliert)

(2a) 100 µg/ml DMTP (ethyliert)

(3a) 10 µg/ml DMTP (ethyliert)

(4a) 1 µg/ml DMTP (ethyliert)

(5a) 100 ng/ml DMTP (ethyliert)

2.4.3. Ergebnisse der gaschromatographischen Messung

Ausgehend von den ethylierten Standardlösungen (1, 2a, 3a, 4a, 5a) wurde eine Tageseichkurve erstellt. Die folgenden Tabellen zeigen die bei der gaschromatographischen Messung erhaltenen Peakhöhen und Peakflächen in Abhängigkeit von der eingespritzten Substanzmenge (Tab. 11) und die für diese Wertepaare durchgeführte Kurvenanpassung (Tab. 12).

In den Abbildungen 13, 14 und 15 sind die Ergebnisse dieser Meßreihen für die einzelnen Meßbereiche graphisch dargestellt.

Tabelle 11: Wertetabelle zur Erstellung einer
Tageseichkurve für ethyliertes
Dimethylthiophosphat
("t_{ret}" = Retentionszeit)

Substanzmenge	Peak mit t _{ret} = 3'22"		Peak mit t _{ret} = 12'29"		Σ
DMTP	Peakhöhe (mm)	Peakfläche (mm ²)	Peakhöhe (mm)	Peakfläche (mm ²)	Peakfläche (mm ²)

Meßbereich Range 10³/Attenuation 4

50 pg	2,5	3,125	-	-	3,125
100 pg	4,5	5,625	-	-	5,625
200 pg	7,5	9,375	-	-	9,375
300 pg	10,5	13,125	-	-	13,125
400 pg	14,5	18,125	-	-	18,125
500 pg	17,5	21,875	-	-	21,875
500 pg	19,5	24,375	-	-	24,375
600 pg	24,0	30,0	-	-	30,0
1 ng	38,0	47,5	-	-	47,5
2 ng	69,5	86,875	1,0	3,0	89,875
3 ng	97,5	121,875	2,0	6,0	127,875
4 ng	130,0	162,5	2,0	6,0	168,5
5 ng	163,0	203,75	3,0	9,0	212,75
6 ng	195,0	243,75	4,0	12,0	255,75

Meßbereich Range 10⁴/Attenuation 4

10 ng	38,5	48,125	2,0	6,0	54,125
20 ng	68,0	85,0	4,0	12,0	97,0
30 ng	95,0	118,75	5,0	15,0	133,75
40 ng	124,0	155,0	5,5	16,5	171,5
50 ng	154,0	192,5	7,0	21,0	213,5
70 ng	224,0	280,0	12,0	36,0	316,0

Fortsetzung Tabelle 11:

Meßbereich Range 10^5 /Attenuation 4

100 ng	38,0	47,5	2,5	7,5	55,0
200 ng	67,0	83,75	6,0	18,0	101,75
400 ng	117,0	146,25	15,0	45,0	191,25
600 ng	157,0	196,25	28,0	84,0	280,25

Tabelle 12: Kurvenanpassung für die Wertepaare
aus Tab. 11

Lineare Regression: $y = a + bx$

Meßbereich	r^2	a	b
für $x = \text{Peakhöhe bei } t_{\text{ret}} = 3'22''$			
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9993	- 0,0730	0,0311
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9970	- 1,5358	0,3258
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9948	-71,9284	4,1892
für $x = \text{Peakhöhe bei } t_{\text{ret}} = 12'29''$			
Range $10^3/\text{Att.4}$	-	-	-
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9454	0,2434	6,1560
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9857	75,8332	19,3528
für $x = \text{Peakflächensumme}$			
Range $10^3/\text{Att.4}$	0,9995	- 0,0510	0,0237
Range $10^4/\text{Att.4}$	0,9947	- 1,4688	0,2321
Range $10^5/\text{Att.4}$	0,9999	-24,3001	2,2240

Abbildung 13:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMTP

Meßbereich: Range 10^3 /Attenuation 4

für Substanzmengen bis ca. 6 ng

$$y = 0,0510 + 0,0237 x$$

für x = Peakflächensumme in mm^2

y = Substanzmenge in ng

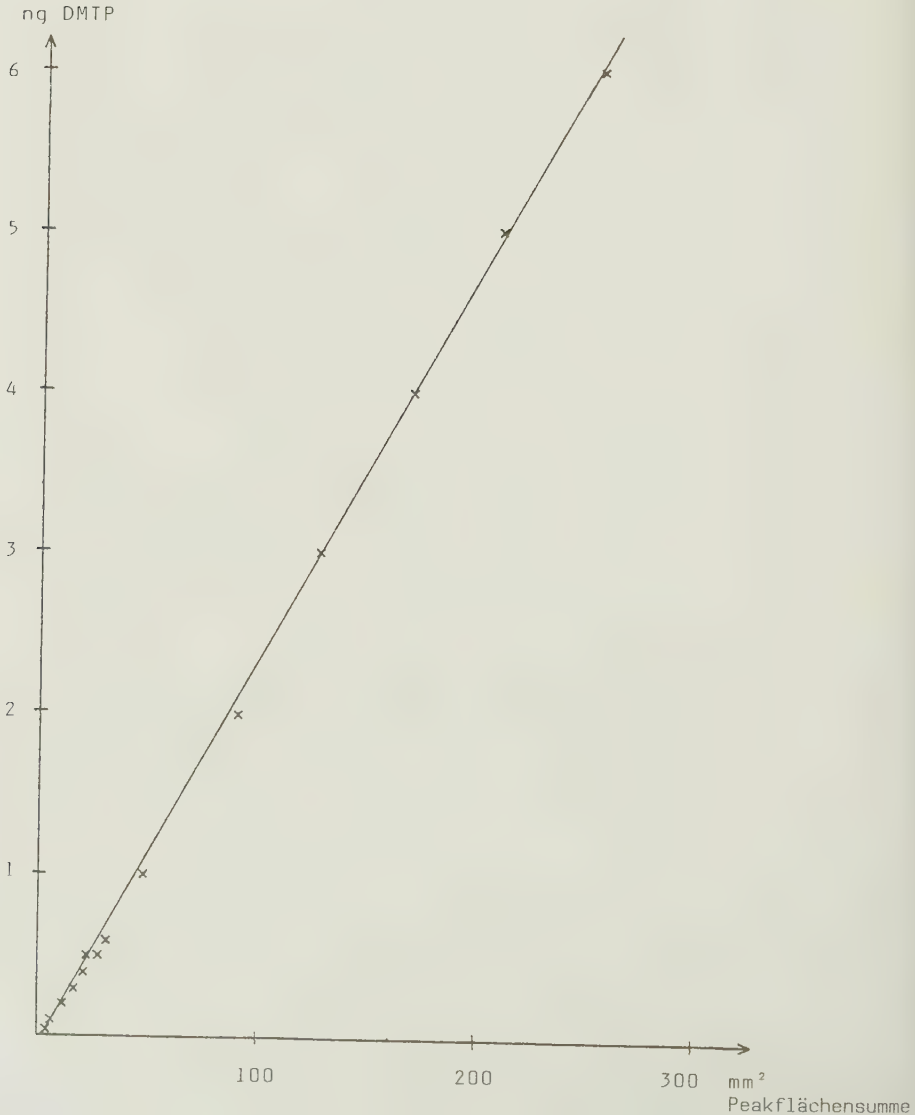


Abbildung 14:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMTP

Meßbereich: Range 10^4 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 6 - 70 ng

$$y = -1,4688 + 0,2321 x \quad \text{für } x = \text{Peakflächensumme in mm}^2$$

$y = \text{Substanzmenge in ng}$

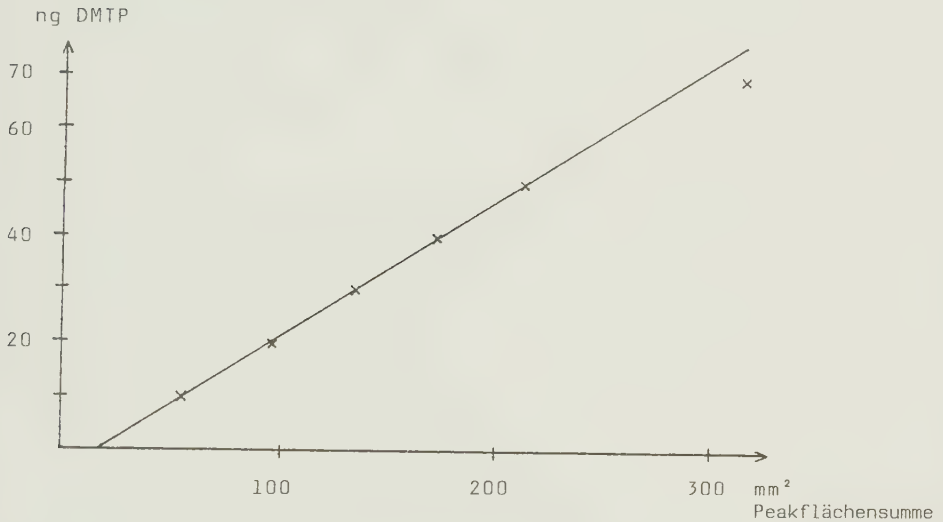


Abbildung 15:

Beispiel einer Tageseichgerade für ethyliertes DMTP

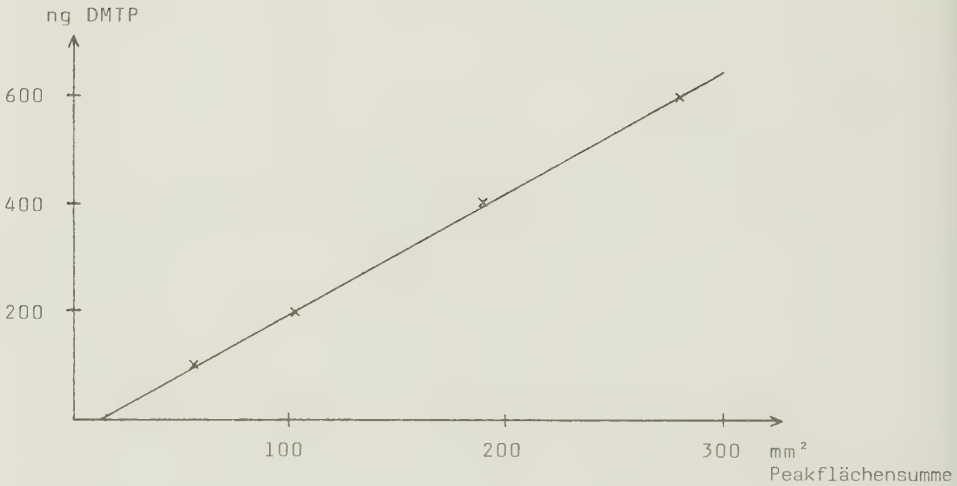
Meßbereich: Range 10^5 /Attenuation 4

für Substanzmengen von ca. 50 - 600 ng

$$y = 24,3001 + 2,2240 x$$

für x = Peakflächensumme in mm^2

y = Substanzmenge in ng



2.4.4. Linearität

Für die Auswertung gilt im Prinzip das bereits für methyliertes DMTP Gesagte (vgl. S. 78). Im Unterschied zum methylierten DMTP trat beim ethylierten DMTP bei Auswertung der Peakflächensummen keine Grenze der Linearität bei hohen Konzentrationen auf (s. Abb. 15).

2.4.5. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde in diesem Fall durch den Peak bei $t_{\text{ret}} = 3'22''$ (O-ethylierte Form) bestimmt, da dieser deutlich größer war als der Peak bei $t_{\text{ret}} = 12'29''$ (S-ethylierte Form). Bei Einspritzen von 0,5 μl des Standardansatzes 100 ng DMTP/ml trat bereits ein signifikanter Peak auf, d.h. die Nachweisgrenze für DMTP (methyliert) liegt bei einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ im Ansatz.

Bezogen auf die bei der gaschromatographischen Messung eingesetzten absoluten Substanzmenge liegt die Nachweisgrenze bei ca. 0,05 ng DMTP (ethyliert).

3. Dünnschichtchromatographisches Kontrollverfahren zum qualitativen Nachweis von Dimethylphosphat, Dimethylthiophosphat, Diethylphosphat und Diethylthiophosphat

3.1. Theoretische Grundlagen

Ein Nachweisverfahren für Dialkylthiophosphorsäuren beschreiben Fischer und Otterbeck (1959), Fischer und Klingelhöller (1961) sowie Fischer und Plunger (1965) (vgl. S. 18). Sie führen den Nachweis mittels Papier- oder Dünnschichtchromatographie und verwenden zum Anfärben Jodazid-Reagens, das den Schwefel im Molekül nach folgender Reaktion erfaßt:



"Schwefelhaltige Verbindungen katalysieren diese Reaktion (...). Die braune Jodlösung wird entfärbt" (Fischer und Klingelhöller, 1961).

Zur Anwendung kommen Glasplatten mit Kieselgelschicht (Kieselgel-G-Merck) von 0,25 mm Dicke sowie folgende Lösungsmittel:

1. Methanol: Methylenchlorid: Ammoniak (10 %) = 20:80:5
2. Methanol: Methylenchlorid: Ammoniak (10 %) = 35:60:5

Das Jodazid-Reagens besteht aus einer Lösung von 3 % Natriumazid in einer n/10-Jodlösung.

Der Nachweis erfolgt durch Markierung der entstehenden weißen Flecken bei einer angegebenen Empfindlichkeit für Dialkylthiophosphorsäuren von 1 - 3 µg.

Geldmacher - von Mallinckrodt (1964) beschreibt als Modifikation der von Fischer et al. (1959, 1961, 1965) angegebenen Nachweismethode die Verwendung von N-Bromsuccinimid-Fluorescein nach Cook (1954) als Sprühreagens für ein halbquantitatives Analyseverfahren durch Abschätzung der Fleckengröße.

Dieses Verfahren erfaßt ebenfalls nur die schwefelhaltigen Derivate DMTP und DETP und arbeitet mit Nachweisgrenzen im Mikrogrammbereich.

Lamotte und Merlin (1968) verwenden in ihrer Untersuchung ebenfalls Kieselgelplatten mit Kieselgel-G-Merck bzw. Cellulose-Platten mit "Powder Pleuger" in einer Schichtdicke jeweils von 0,275 mm. Folgende Laufmittel kommen hier zur Anwendung:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (I) | Isopropanol-konz. NH_3 | 75:25 |
| (II) | Propanol-konz. NH_3 - H_2O | 60:30:10 |
| (III) | Aceton- H_2O -Methanol-Trichloressigsäure | (75:25:10)(110 mg%) |
| (IV) | Butanol III-Acetonitril-konz. NH_3 | (50:40:10) |
| (V) | Aceton-test. Butanol- H_2O -konz. NH_3 | (50:40:10:10) |

Fischer (1980) nennt ein Sprühreagens zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Phosphaten: Sprühreagens nach Hanes - Isherwood, hier erscheinen Dialkyl-(thio)phosphate und anorganisches Phosphat im UV-Licht als blaue Flecken auf weißem Grund bei einer Nachweisgrenze von ca. 10 µg.

3.2. Auswahl und Anwendung eines dünn-
schicht-
chromatographischen Nachweisverfahrens
für Dialkyl(thio)phosphate

3.2.1. Darstellung und Anwendung der verwendeten
Sprühreagenzien

I. Sprühreagens zum Nachweis von Alkylthiophosphaten
N-Bromsuccinimid-Fluorescein nach Cook (1954)

Es werden folgende zwei Stammlösungen hergestellt:

a) N-Bromsuccinimid-Lösung 0,01 m:

0,09 g N-Bromsuccinimid werden in einen
50 ml-Meßkolben eingewogen und mit Di-
chlormethan auf 50 ml aufgefüllt.

b) Fluorescein-Lösung 0,01 m:

0,33 g Fluorescein werden in einen 100 ml-
Meßkolben eingewogen und mit 0,1 n NaOH
auf 100 ml aufgefüllt.

Von beiden Stammlösungen werden zur sofortigen
Verwendung folgende Sprühlösungen hergestellt:

zu a) 5 ml Stammlösung a) werden mit Dichlor-
methan im Meßkolben auf 25 ml aufgefüllt
(stets frisch herstellen!)

zu b) 3 ml Stammlösung b) werden mit Ethanol
im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt (ca. 48 h haltbar)

Anwendung:

Nach Verdunsten des Laufmittels wird die Platte zu-
nächst gleichmäßig mit der N-Bromsuccinimid-Lösung
besprüht, nach Verdampfen des Lösungsmittels mit
der Fluorescein-Sprühlösung. Nach 2 - 3 min werden
die Thiophosphorsäure-Flecken gelb auf rosa Grund
sichtbar. Die Nachweisgrenze liegt im Mikrogrammbereich.

II. Sprühreagens zum Nachweis von Phosphaten
nach Hanes-Isherwood (Fischer, 1980)

Es wird folgende Sprühlösung hergestellt:

1 g Ammoniummolybdat wird in einen 100 ml-Meßkolben eingewogen, in 25 ml H₂O-bidest. gelöst und mit 5 ml 2 n HCl sowie 5 ml Perchlorsäure (HCCO₄, 60 %ig) angesäuert. Die Lösung wird mit H₂O bidest. auf 100 ml aufgefüllt und ist bei 4 °C 2 Wochen haltbar.

Anwendung:

Die Platte wird nach Abtrocknen des Laufmittels mit der Lösung ziemlich feucht eingesprüht, 3 - 5 min im Trockenschrank abgetrocknet, sofort für 5 - 10 min mit UV-Licht (2537 Å) bestrahlt und danach mit einer Glasplatte abgedeckt. Die Phosphate erscheinen blau (z.T. auch gelb) auf weißem Grund.

Es ist zu beachten, daß bei zu langer Bestrahlung sich die gesamte Platte blau färben kann.

Die Nachweisgrenze für Dialkyl(thio)phosphate und anorganisches Phosphat liegen bei ca. 10 µg. Trialkylphosphate werden nicht regelmäßig gefärbt, sind aber evtl. während dem Trocknen nach Besprühen als weiße Flecken erkennbar.

3.2.2. Vorversuche zur Auswahl der DC-Platten und der Laufmittel

Für unsere Vorversuche standen folgende Dünnschicht-
platten zur Verfügung:

- (A) DC-Fertigplatten Woelm (Aktivierung: 50 min bei 110 °C)
Kieselgel Schichtstärke 0,25 mm Format 20x20 cm
- (B) Merck DC-Fertigplatten
Cellulose F Schichtstärke 0,1 mm Format 20x20 cm
- (C) Merck DC-Fertigplatten
Cellulose (ohne Fluoreszenzindikator)
Schichtstärke 0,1 mm Format 20x20 cm

sowie folgende Laufmittel:

- (I) Laufmittel I nach Lamotte u. Merlin (1968) (s.S. 89)
- (II) Laufmittel II nach Lamotte u. Merlin (1968) (s.S. 89)
- (III) Laufmittel V nach Lamotte u. Merlin (1968) (s.S. 89)
- (IV) Laufmittel Äther-Methanol 95:5
- (V) Laufmittel Äther-Methanol 70:3
- (VI) Laufmittel nach Fischer und Klingelhöller (1961):
Methanol-Methylenchlorid-NH₃ (10 %ig) 20:80:3
(vor Verwendung frisch herzustellen, darf nur
zweimal benutzt werden!)

Für die dünnschichtchromatographischen Vorversuche wurden
folgende Standardansätze hergestellt:

- | | | |
|-----|---|------------------------|
| (1) | DMP-NH ₄ | in Methanol (10 mg/ml) |
| (2) | DEP | in Methanol (10 mg/ml) |
| (3) | DMTP-NH ₄ | in Methanol (10 mg/ml) |
| (4) | DETP-NH ₄ | in Methanol (10 mg/ml) |
| (5) | TMP | in Äther (10 mg/ml) |
| (6) | TEP | in Äther (10 mg/ml) |
| (7) | H ₃ PO ₄ (98 %ig) | in Methanol (10 mg/ml) |

Diese Ansätze von Dialkyl(thio)phosphaten und anorganischem Phosphat kamen in Auftragsmengen von jeweils 10 µl und 20 µl zur Anwendung, d.h. es wurden von jedem Ansatz 100 µg bzw. 200 µg eingebrachte Standardsubstanz aufgetragen.

Der Nachweis wurde mit dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood geführt.

Die "Woelm"-Platte (A) wurde mit den Laufmitteln (III), (IV), (V) und (VI) getestet, die Cellulose-Platten (B) und (C) mit den Laufmitteln (I) und (II) (s.S. 92).

Ergebnis:

In Anwendung mit Sprühreagens nach Hanes-Isherwood waren die Laufmittel (I) - (V) unbefriedigend in den Trenneigenschaften und in der Anfärbbarkeit. Die Celluloseplatten brachten keine Vorteile gegenüber den Kieselgelplatten (Woelm). Am besten erwies sich die Trennung auf Woelm-Platten (A) mit Laufmittel (VI) nach Fischer und Klingelhöller (1961).

3.2.3. Anwendungsbeispiele

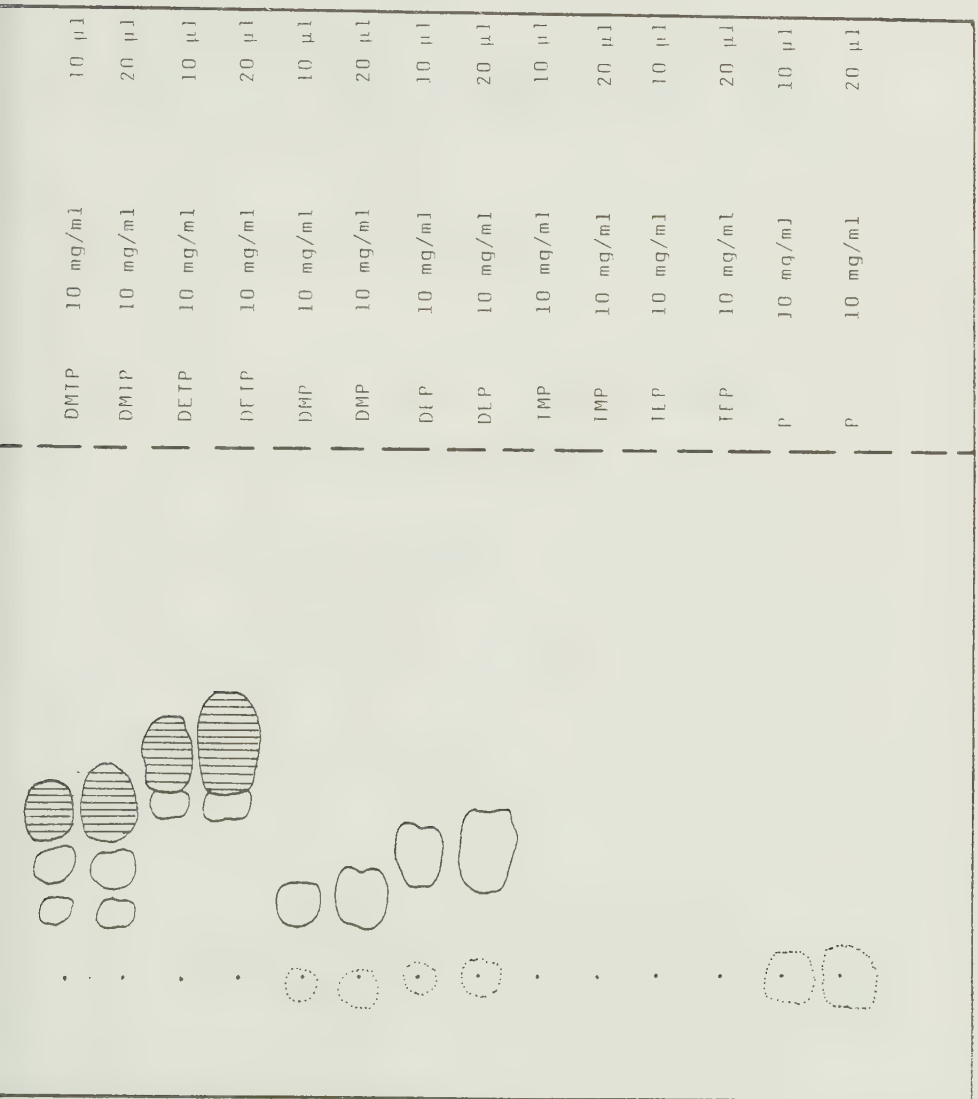
3.2.3.1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Alkyl(thio)phosphate

Der Nachweis wurde auf einer für 45 min bei 110 °C aktivierten Woelm-Platte (A) mit Laufmittel (VI) (s.S. 92) und dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood geführt (Phosphat-Nachweis). Die Laufstrecke betrug 10 cm, entsprechend einer Laufzeit von ca. 45 min. Ansätze und Auftragsmengen: siehe Vorversuche.

Abbildung 16 zeigt eine Durchzeichnung des angefärbten Chromatogramms. Die anorganischen Phosphate bleiben hier am Start, Dialkyl(thio)phosphate haben R_f -Werte in der Größenordnung von 0,15 - 0,5. Trialkylphosphate sind wegen fehlender Anfärbung (s.S. 91) kaum identifizierbar, als relativ apolare Verbindungen liegen ihre R_f -Werte bei 0,9 - 1.

Abbildung 16:

Durchzeichnung des Chromatogrammes der
Dialkyl(thio)phosphate, Trialkylphosphate
und von anorganischem Phosphat (P) (nach Anfärbung)



3.2.3.2. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Methylierung von DMP, DEP, DMTP, DETP

Der Nachweis wurde auf Woelm-Platten (A), bei 110 °C für 50 min aktiviert (Trockenschrank), mit Laufmittel (VI) (s.S. 92) geführt. Zum Nachweis von Phosphaten wurde das Sprühreagens nach Hanes-Isherwood, von Thio-phosphaten das Sprühreagens nach Cook (1954) verwendet (s.S.90 f). Die Laufstrecke betrug 10 cm.

a) Kontrolle der Methylierung von DMP:

Folgende Ansätze wurden zur Versuchsdurchführung hergestellt:

1. DMP-NH₄ in Methanol (10 mg/ml)
Auftragsmenge 10 µl

2. DMP-Kontrollansatz:

vollständiger Methylierungsansatz (s.S. 51)
ohne Diazomethan zur Kontrolle auf Stör-
substanzen im Chromatogramm durch die im
Alkylierungsansatz enthaltenen Chemikalien.
Man gibt in ein Reagenzglas 100 µl DMP-
Standard (1) (s.o.), 20 µl HCl konz.,
1 Spatelspitze Na₂SO₄ sicc., 2850 µl Äther
und läßt das Glas 30 min im Abzug stehen
(Teflonstopfen!). Danach gibt man 1 Tropfen
HCOOH (98 %ig) zu und bringt den Ansatz in
Mengen von 100 µl, 300 µl und 600 µl auf die
Woelm-Kieselgel-Platte auf.

3. DMP-Diazomethan-Ansatz

Ansatz und Verfahren wie Ansatz (2), jedoch
mit 2850 µl Diazomethanreagens (nach Shafik
et al., 1969; s.S. 33). Auftragsmengen:
100, 300 und 600 µl.

4. TMP in Äther (10 mg/ml)

Auftragsmenge 100 µl

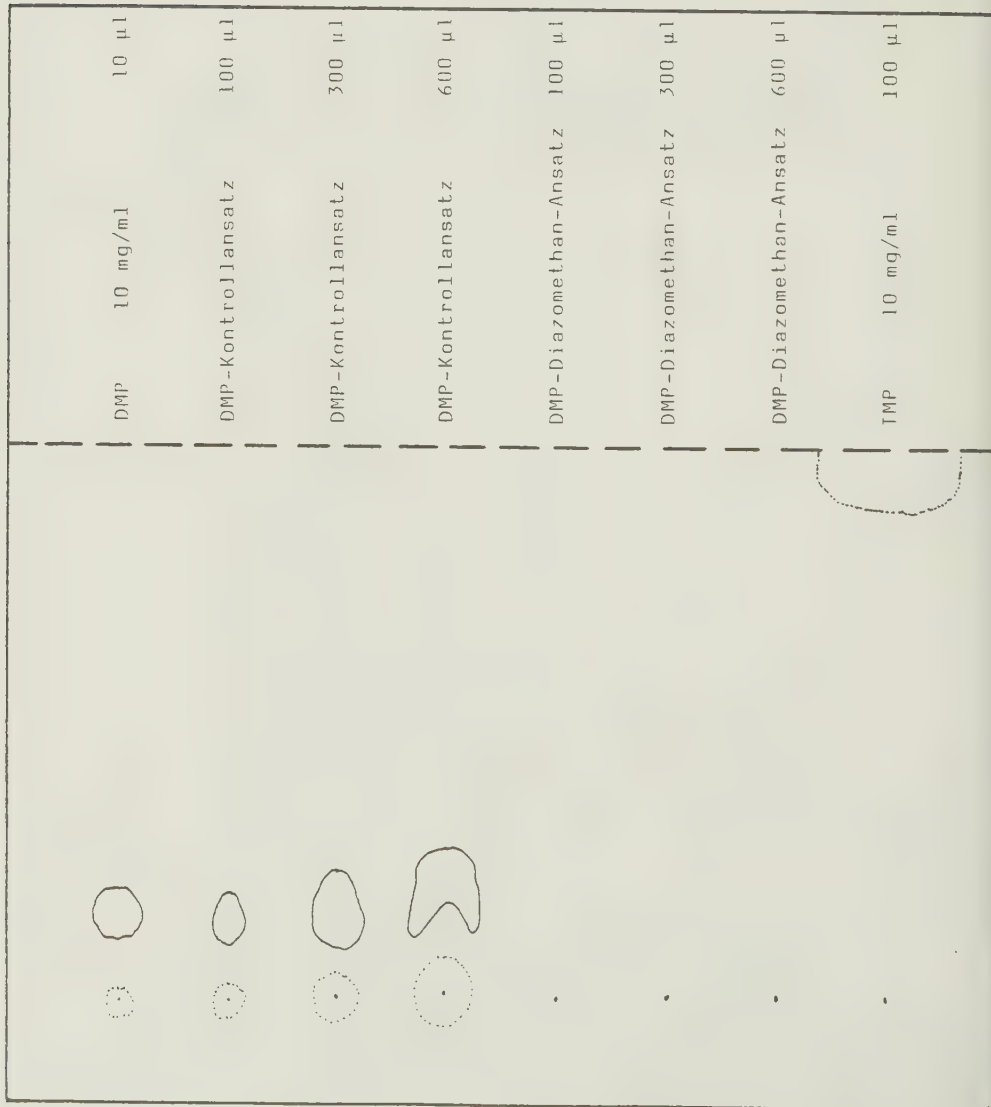
Der Nachweis erfolgte mit dem Sprühreagens
nach Hanes-Isherwood (s.S. 93).

Abbildung 17 zeigt die Durchzeichnung des Chromato-
gramms nach Anfärbung: DMP mit $R_f = 0,17$ verschwindet
im DMP-Diazomethanansatz vollständig: Die Umsetzung
zu TMP erfolgt praktisch quantitativ.

Abbildung 17:

Methylierung von DMP (Phosphat-Nachweis)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



b) Kontrolle der Methylierung von DEP:

Folgende Ansätze wurden zur Versuchsdurchführung hergestellt:

1. DEP-Standard in Methanol (10 mg/ml)
Auftragsmenge 100 μ l
2. DEP-Kontrollansatz (analog Ansatz a)(2)) .
Auftragsmenge 100, 300, 600 μ l
3. DEP-Diazomethanansatz (analog Ansatz a)(3))
Auftragsmenge 100, 300, 600 μ l
4. TEP-Standard in Äther 10 mg/ml
Auftragsmenge 100 μ l

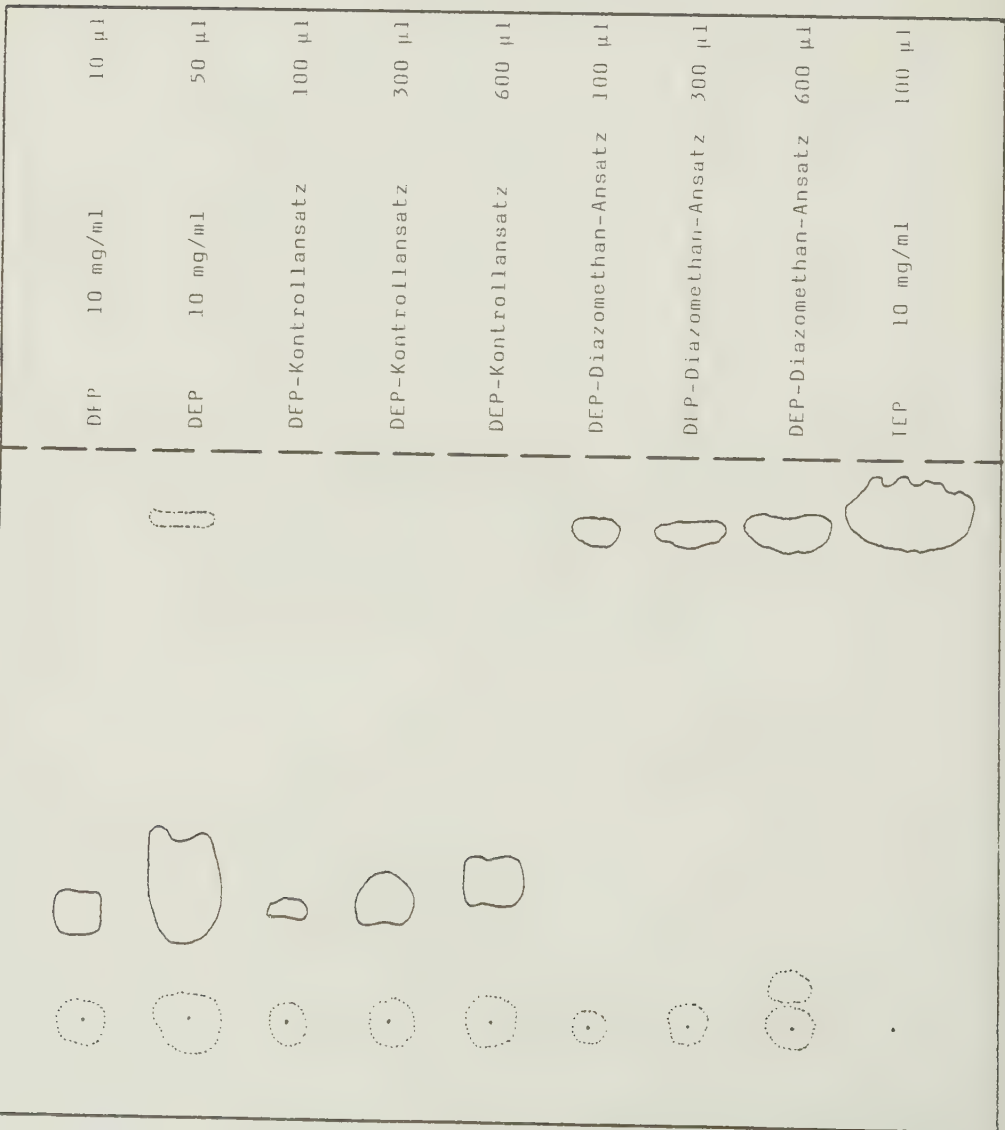
Der Nachweis erfolgte mit dem Sprühreagens nach Hanes-Ishewood (s.S. 93).

Abbildung 18 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogrammes nach Anfärbung: DEP mit $R_f = 0,24$ verschwindet im DEP-Diazomethanansatz vollständig; die Umsetzung zu mDEP ($R_f = 0,92$) erfolgt praktisch quantitativ, die Vergleichssubstanz TEP mit $R_f = 0,94$ ist ebenfalls erkennbar.

Abbildung 18:

Methylierung von DEP (Phosphat-Nachweis)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



c) Kontrolle der Methylierung von DMTP:

Folgende Ansätze wurden zur Versuchsdurchführung hergestellt:

1. DMTP-NH₄ in Methanol (10 mg/ml)
2. DMTP-NH₄-Kontrollansatz (analog Ansatz a)(2))
3. DMTP-NH₄-Diazomethan-Ansatz (analog Ansatz a)(3))

Abbildung 19 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogrammes mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 5 µl und 10 µl
2. 100 µl, 300 µl und 600 µl
3. 100 µl, 300 µl und 600 µl

nach Anfärbung mit dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood (s.S. 93). Die für DMTP typischen Flecken mit $R_f = 0,31$ verschwinden im DMTP-NH₄-Diazomethan-Ansatz völlig: die Umsetzung zu mDMTP erfolgt praktisch quantitativ.

Abbildung 20 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogrammes mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 2,5 µl und 5 µl
2. 50 µl, 150 µl und 300 µl
3. 50 µl, 150 µl und 300 µl

nach Anfärbung mit dem N-Bromsuccinimid-Fluorescein-Reagens nach Cook (1954). Die für DMTP-NH₄ typischen Flecken mit $R_f = 0,32$ verschwinden im DMTP-NH₄-Diazomethanansatz vollständig, methyliertes DMTP erscheint mit $R_f = 0,97$. Die Umsetzung ist als vollständig zu betrachten.

Abbildung 19:

Methylierung von DMTP (Phosphat-Nachweis)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)

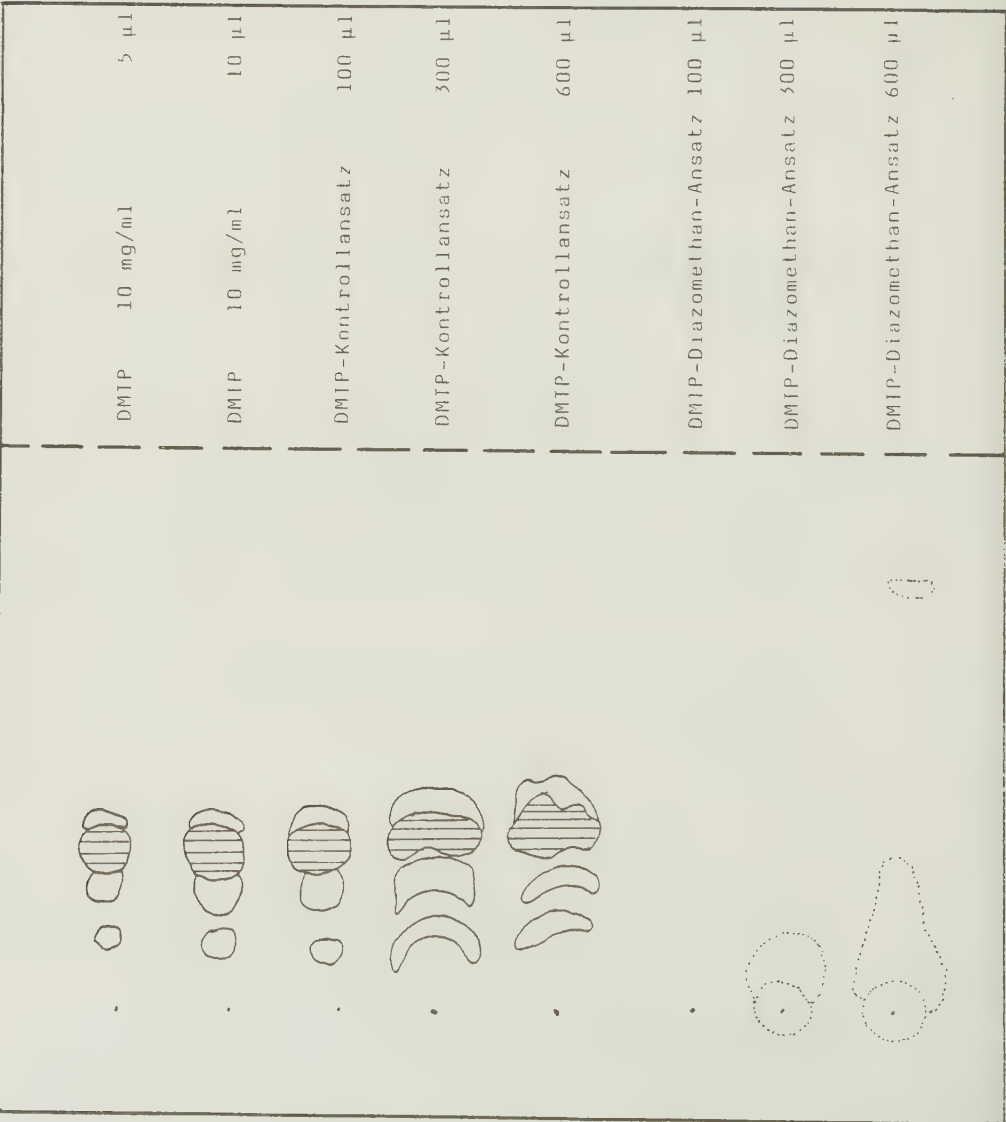
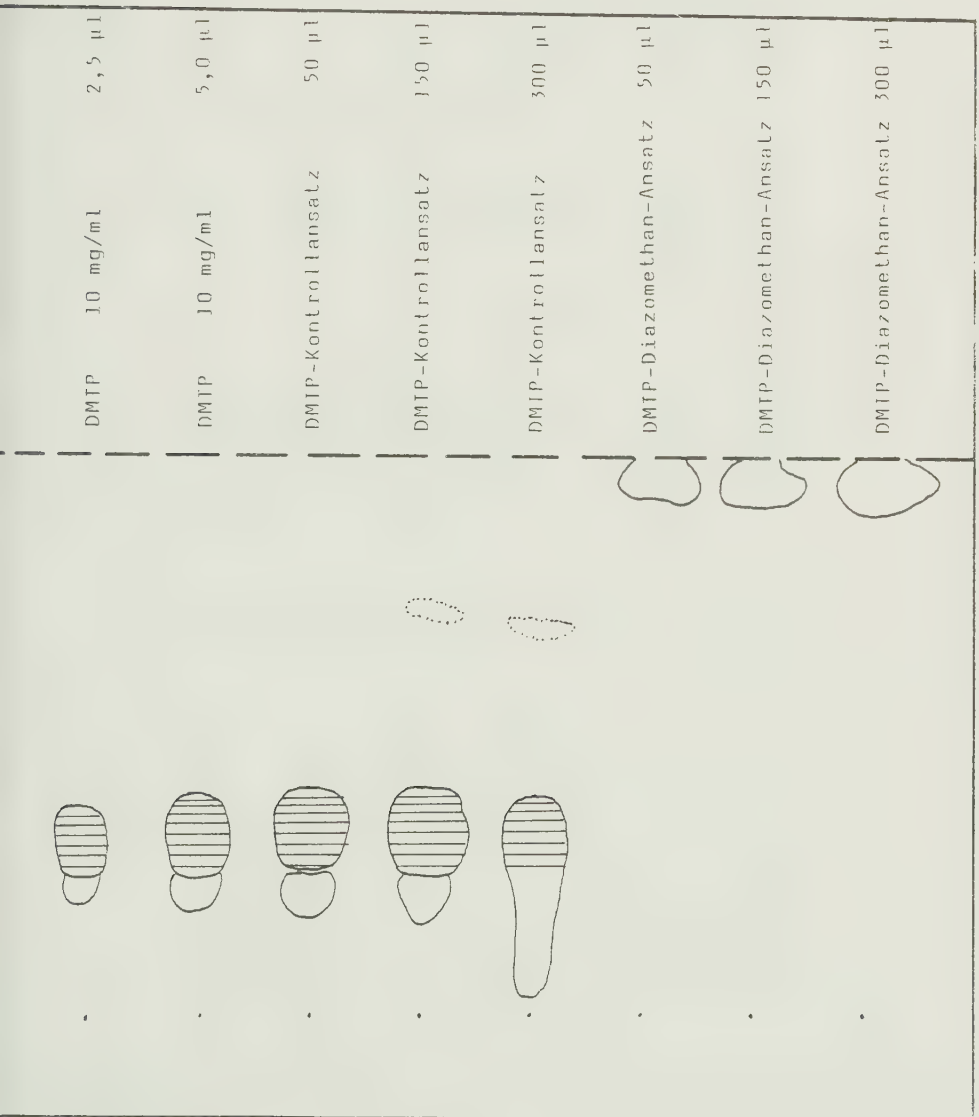


Abbildung 20:

Methylierung von DMTP (Nachweis von Alkylthiophosphaten)
Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



d) Kontrolle der Methylierung von DETP:

Folgende Ansätze wurden zur Versuchsdurchführung hergestellt:

1. DETP-NH₄ in Methanol (10 mg/ml)
2. DETP-NH₄-Kontrollansatz (analog Ansatz a)(2))
3. DETP-NH₄-Diazomethanansatz (analog Ansatz a)(3))

Abbildung 21 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogrammes mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 5 µl und 10 µl
2. 100 µl, 300 µl und 600 µl
3. 100 µl, 300 µl und 600 µl

nach Anfärbung mit dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood (s.S. 93). Die für DETP typischen Flecken mit $R_f = 0,40$ verschwinden im DETP-NH₄-Diazomethan-Ansatz vollständig; die Umsetzung zu mDETP erfolgt praktisch quantitativ.

Abbildung 22 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogrammes mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 2,5 µl und 5 µl
2. 50 µl, 150 µl und 300 µl
3. 50 µl, 150 µl und 300 µl

nach Anfärbung mit dem Sprühreagens N-Brom-succinimid-Fluorescein. Die für DETP-NH₄ typischen Flecken mit $R_f = 0,39$ verschwinden im DETP-NH₄-Diazomethan-Ansatz vollständig, es zeigt sich hier mDETP mit $R_f = 0,98$; die Umsetzung zu DETP verläuft praktisch quantitativ.

Abbildung 21:

Methylierung von DETP (Phosphat-Nachweis)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)

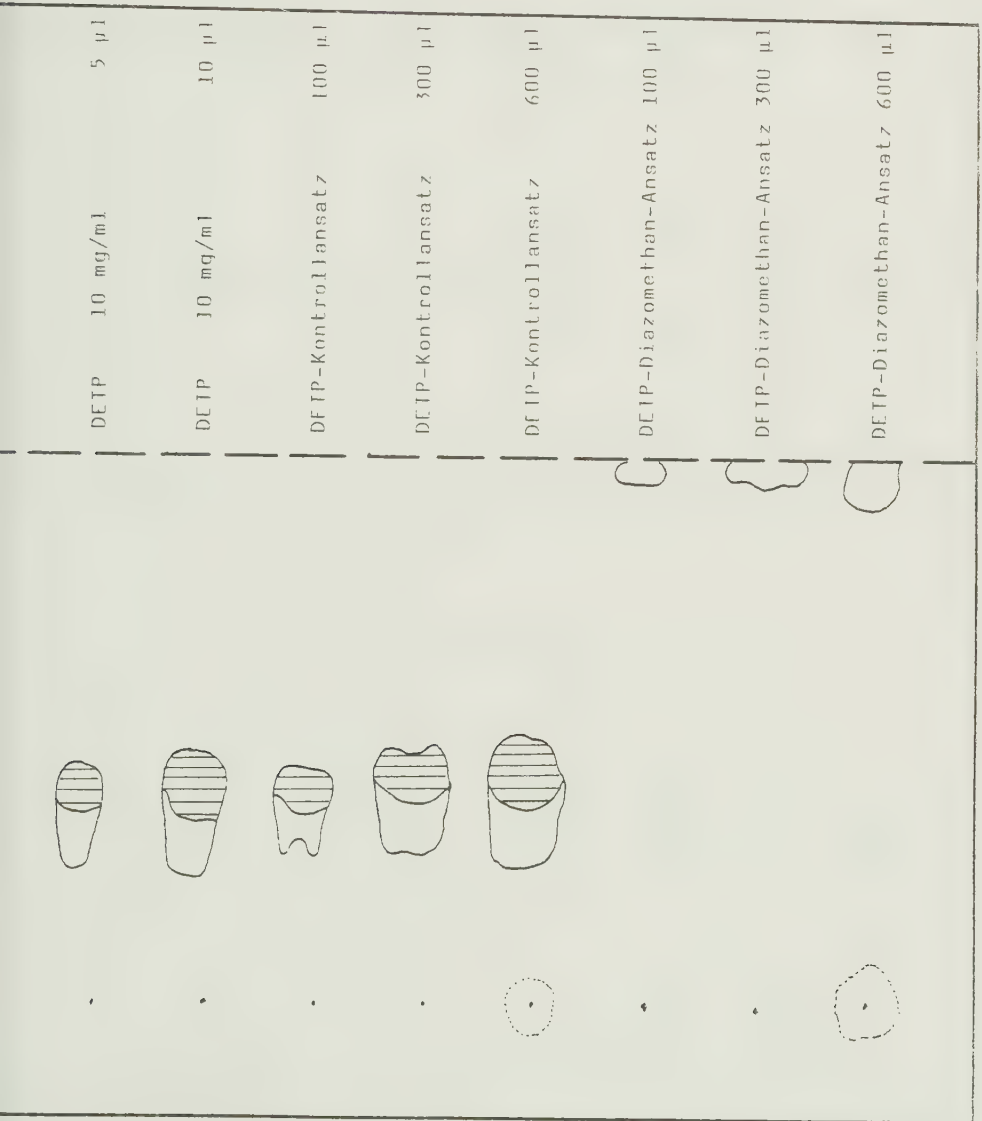
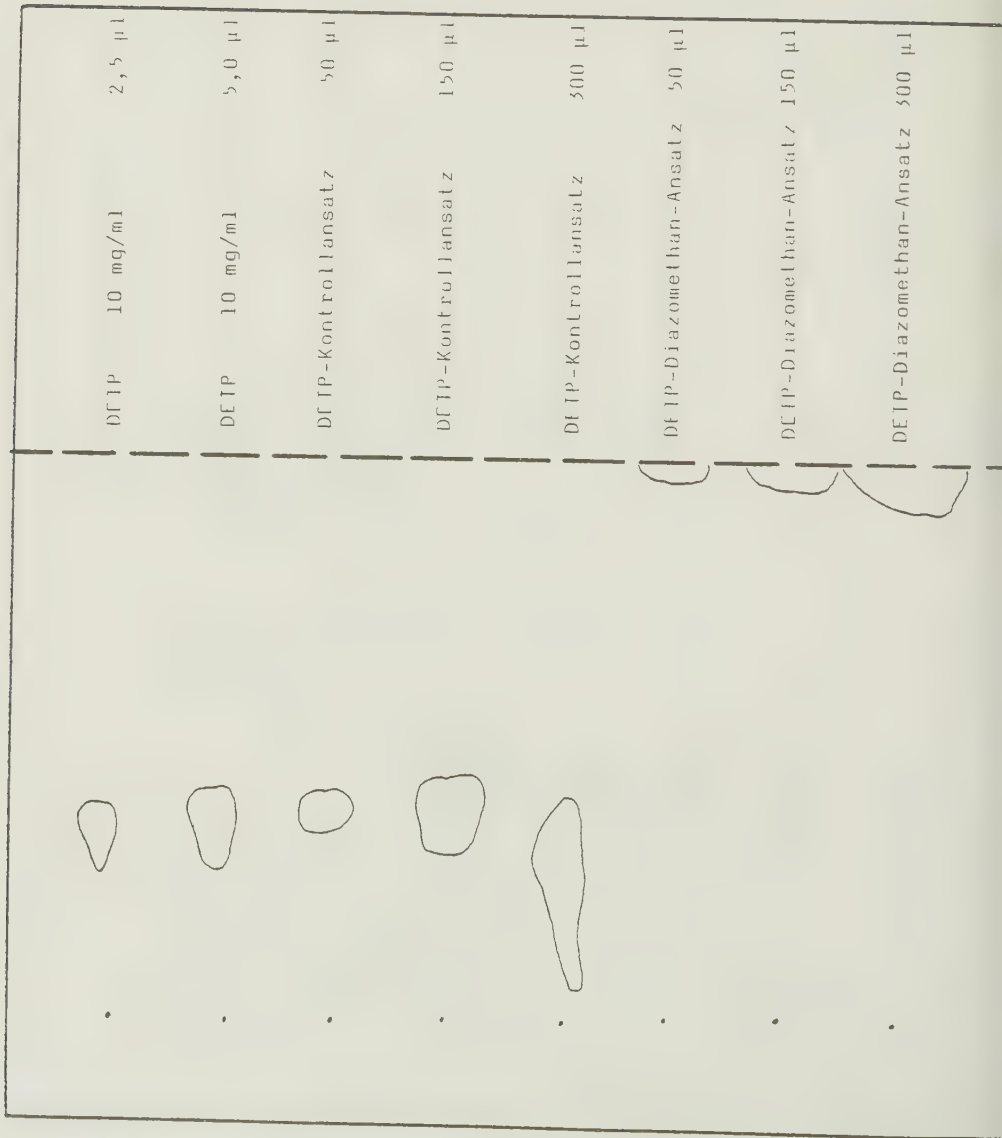


Abbildung 22:

Methylierung von DETP (Nachweis von Dialkylthiophosphaten)
Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



3.2.3.3. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Ethylierung von DMP, DEP, DMTP, DETP

Der Nachweis verläuft unter den gleichen Bedingungen wie die Kontrolle der Methylierung von Dialkyl(thio)-phosphaten (s.S. 96f). Als Alkylierungsreagens wird anstelle des Diazomethanreagens das Diazoethanreagens verwendet.

a) Kontrolle der Ethylierung von DMP und DEP

Folgende Ansätze (analog 3.2.3.2.)(s.S.96 f) wurden zur Versuchsdurchführung hergestellt:

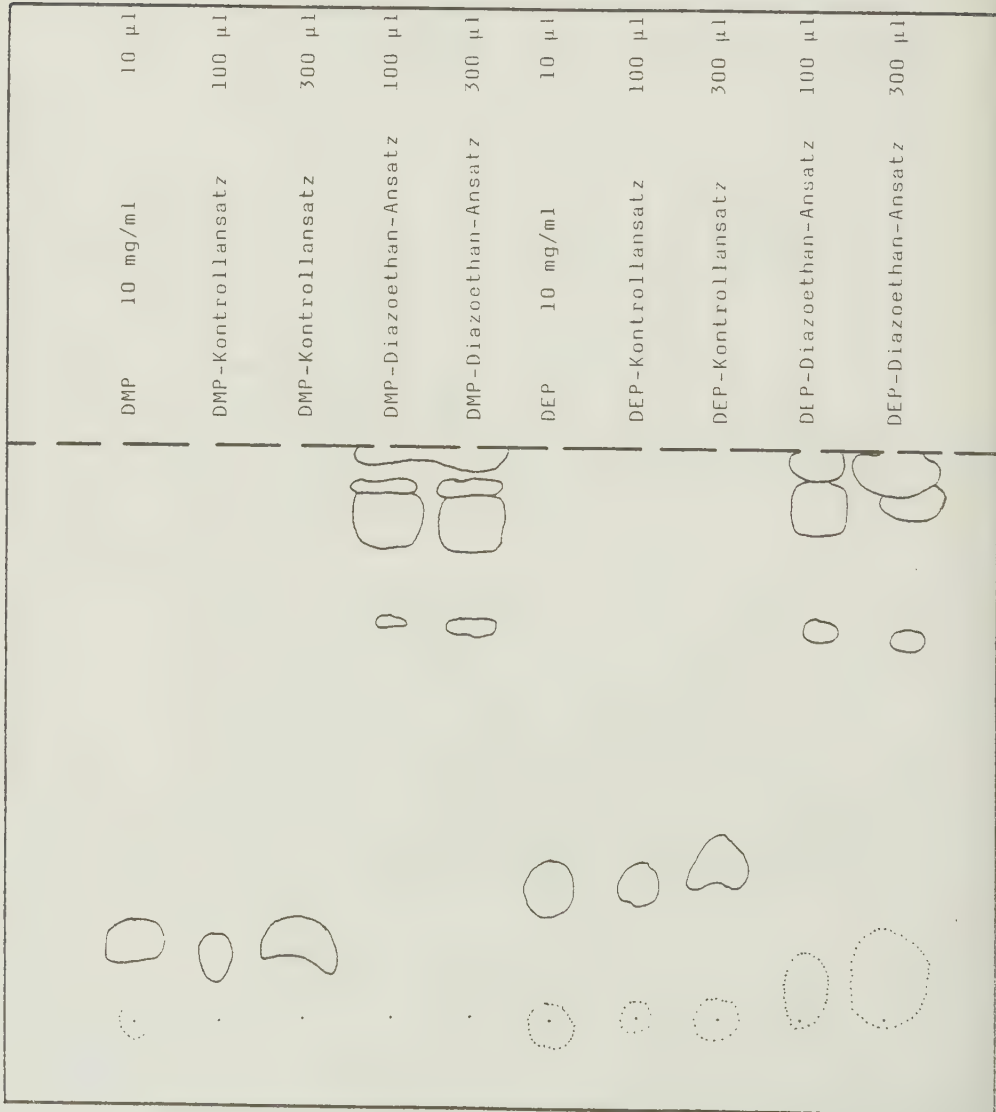
- DMP: 1. DMP-NH₄-Standard 10 mg/ml Auftragsmenge 10 µl
2. DMP-NH₄-Kontrollansatz Auftragsmenge 100 u. 300 µl
3. DMP-NH₄-Diazoethanansatz Auftragsmenge 100, 300 µl
- DEP: 1. DEP-Standard 10 mg/ml Auftragsmenge 10 µl
2. DEP-Kontrollansatz Auftragsmenge 100 u. 300 µl
3. DEP-Diazoethanansatz Auftragsmenge 100 u. 300 µl

Abbildung 23 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogramms nach Anfärbung mit dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood (s.S. 93). Die für DMP und DEP typischen Flecken mit $R_f = 0,13$ bzw. $R_f = 0,22$ verschwinden in den Diazoethan-Ansätzen vollständig, es zeigen sich Flecken für die ethylierten Reaktionsprodukte mit einem $R_f \approx 0,9$ bzw. $R_f \approx 0,93$: Die Umsetzung von DMP und DEP zu eDMP und TEP verläuft praktisch vollständig (s.S. 96).

Abbildung 23:

Ethylierung von DMP und DEP (Phosphat-Nachweis)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



b) Kontrolle der Ethylierung von DMTP und DETP

Folgende Ansätze wurden (analog 3.2.3.2.a), s.S.96ff) zur Versuchsdurchführung hergestellt:

DMTP: 1. DMTP-NH₄-Standard 10 mg/ml

2. DMTP-NH₄-Kontrollansatz

3. DMTP-NH₄-Diazoethan-Ansatz

DETP: 1. DETP-NH₄-Standard 10 mg/ml

2. DETP-NH₄-Kontrollansatz

3. DETP-NH₄-Diazoethan-Ansatz

Abbildung 24 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogramms mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 10 µl

2. 100 µl und 300 µl

3. 100 µl und 300 µl

für DMTP und DETP nach Anfärbung mit dem Sprühreagens nach Hanes-Isherwood (s.S. 93). Die für DMTP und DETP typischen Flecken mit $R_f = 0,33$ bzw. $R_f = 0,47$ verschwinden in den Ansätzen mit Diazoethan, es zeigen sich die Flecken der Alkylierungsprodukte DMTP mit $R_f = 0,86, 0,94, 0,99$ und bei DETP mit $R_f = 0,85, 0,93, 0,99$: Die Umsetzung verläuft jeweils praktisch vollständig.

Abbildung 24:

Ethylierung von DMTP und DETP (Phosphat-Nachweis)
Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)

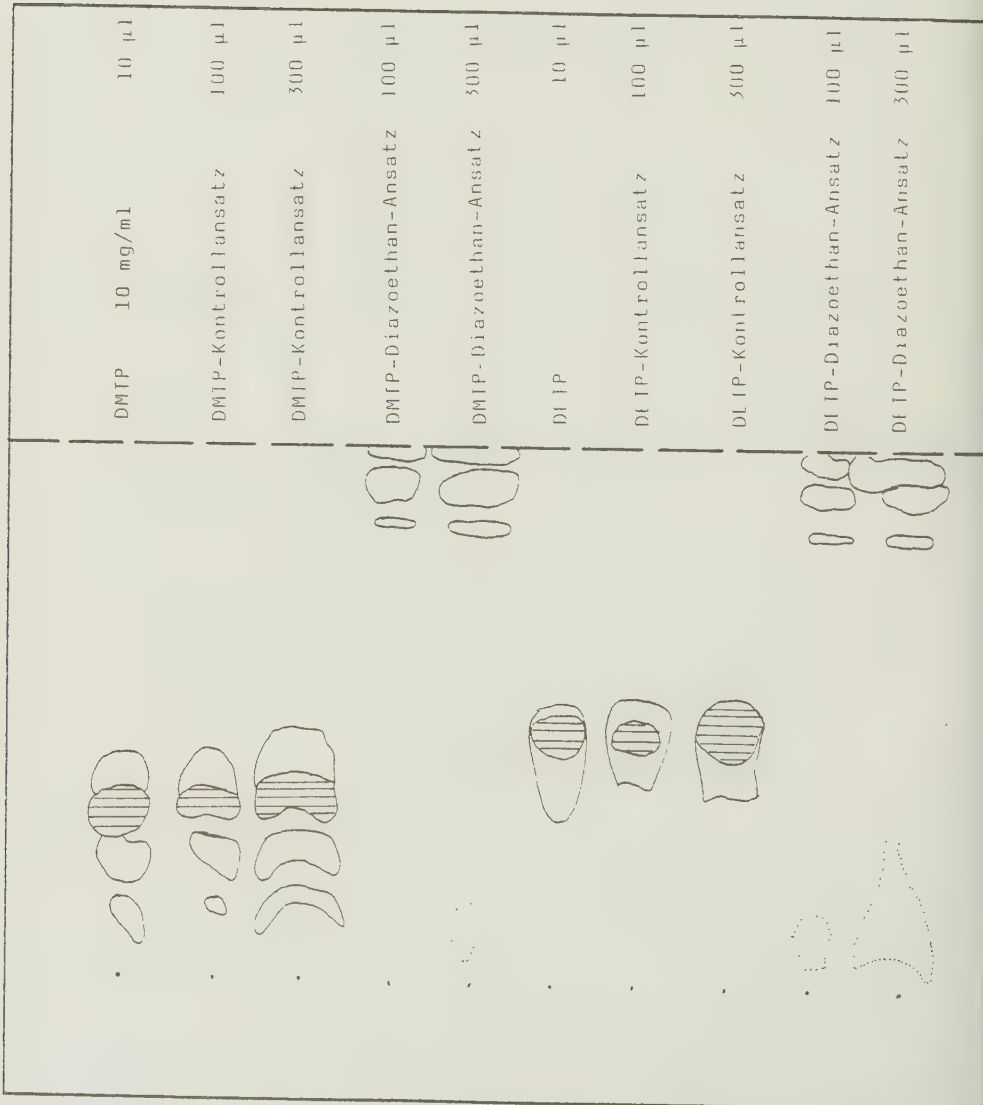


Abbildung 25 zeigt die Durchzeichnung des Chromatogramms mit den Ansätzen in den Auftragsmengen

1. 5 μ l
2. 50 μ l und 100 μ l
3. 50 μ l und 100 μ l

für DMTP und DETP nach Anfärbung mit dem N-Brom-succinimid-Fluorescein-Reagens nach Cook (1954)(s.S. 92). Die für DMTP und DETP typischen Flecken mit $R_f = 0,28$ bzw. $R_f = 0,40$ verschwinden in den Alkylierungsansätzen, es zeigen sich die Reaktionsprodukte der Alkylierung für DMTP mit $R_f = 0,97$; $0,86$ und für DETP mit $R_f = 0,97$; $0,85$: die Umsetzung verläuft praktisch vollständig.

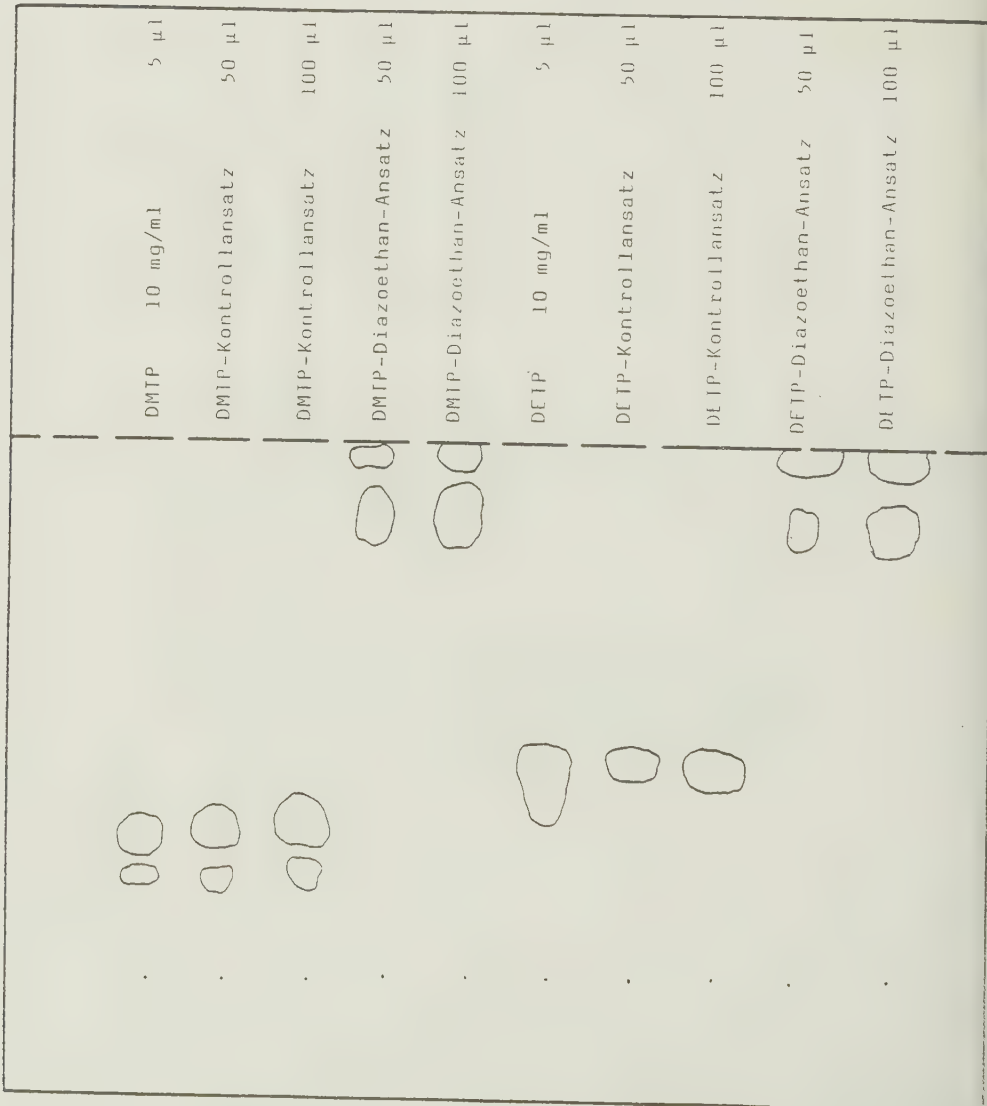
Die im Verhältnis zu Abbildung 24 niedrigeren R_f -Werte aller auftretenden Substanzen in Abbildung 25 sind auf die langsam beginnende Fraktionierung des Fließmittels bei zweimaliger Verwendung zurückzuführen, wie sie schon Fischer und Klingelhöller (1961) beschreiben.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für das dünnschichtchromatographische Kontrollverfahren wird bei der Auswertung der gaschromatographischen Messungen der klinischen Fallbeispiele besprochen (s.S. 197).

Abbildung 25:

Ethylierung von DMTP und DETP (Nachweis von Dialkylthiophosphaten)

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



3.2.4. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man die beschriebene dünnschichtchromatographische Nachweismethode für Dialkyl(thio)phosphate als gut praktikable qualitative Kontrollmethode für die gaschromatographische Trennung und den Nachweis von Dialkyl(thio)phosphaten bezeichnen.

Die von uns eingesetzten jeweils kleinsten Substanzmengen betragen für

DMP	33 µg	(Nachweis mit Reagens nach Hanes-Isherwood)
DEP	33 µg	(" " " " " ")
DMTP	33 µg	(" " " " " ")
DETP	33 µg	(" " " " " ")
DMTP	16 µg	(Nachweis mit N-Bromsuccinimid-Fluorescein)
DETP	16 µg	(" " " ")

Diese eingesetzten Substanzmengen ergaben auf allen Chromatogrammen nach der oben beschriebenen Methode (s.S. 90 ff) ausreichend große und gut angefärbte Flecken und lagen damit deutlich über den Nachweisgrenzen für das jeweilige Entwicklungsverfahren. Eine halbquantitative Auswertung der Chromatogramme durch Abschätzen der Fleckgrößen ist unter Mitführung einer Eichreihe theoretisch möglich.

Der Zeitaufwand für eine dünnschichtchromatographische Kontrollanalyse nach o.g. Methode für Phosphatnachweis und dem Nachweis von Dialkylthiophosphaten kann auf ca. 2 h beschränkt werden, wenn keine Extrakte aus biologischem Material erforderlich sind und sofern die Stammlösungen für die Sprühreagenzien sowie die gewünschten Alkylierungsmittel zur Verfügung stehen. Die Nachweisgrenzen betragen nach Abschätzung der Fleckgrößen für das Reagens nach Hanes-Isherwood ca. 10 µg Substanz, für das Reagens nach Cook (1954) ca. 1 µg Substanz.

4. Entwicklung eines Verfahrens für die Extraktion von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat aus wäßriger Lösung

Bei der Extraktion von nachzuweisenden Substanzen aus wäßrigen Lösungen wurde Wert darauf gelegt, ein möglichst einfaches, universell anwendbares Verfahren zu finden. Es sollten möglichst alle in Frage kommenden Dialkylphosphate und -thiophosphate, also Dimethyl- wie Diethylverbindungen erfaßt werden, um die Ausbaufähigkeit des Screening-Verfahrens zu gewährleisten. Dabei mußten zwangsläufig Kompromisse geschlossen werden, da diese Verbindungen erhebliche Unterschiede in ihrer Polarität aufweisen und es praktisch nicht möglich ist, durch ein einfaches Extraktionsverfahren alle in ähnlich hoher Ausbeute zu erfassen. Außerdem mußte im Hinblick auf die Anwendbarkeit der Methode auf biologisches Untersuchungsmaterial beachtet werden, daß möglichst wenig Substanzen in den Extrakt gelangen, die die weitere Derivatisierung oder gaschromatographische Messung stören könnten.

Zur Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens wurden zunächst Versuche zur Extraktion der Reinsubstanzen DMP und DMTP aus wäßriger Lösung durchgeführt.

4.1. Extraktionsmittel

Wenn die zu untersuchenden Verbindungen DMP und DMTP in der undissoziierten, noch relativ polaren Form vorliegen, können sie mit einem apolaren Lösungsmittel aus der polaren wäßrigen Phase extrahiert werden. Als einfachstes Verfahren bot sich hierzu die Extraktion aus saurem Milieu mit Ether an.

Vorversuche zeigten, daß dabei ein Ansäuern mit 6 n HCl bis pH 1 am einfachsten war und gute Ergebnisse brachte. Die pH-Kontrolle mit pH-Papier erwies sich als ausreichend, da kleine Schwankungen des pH-Wertes die Extraktionsausbeute nicht merklich beeinflussten und eine genauere Bestimmung des pH sich somit erübrigt.

Mit dem sauren Etherextrakt wurden gute Ergebnisse bei der Extraktion von DMTP aus wäßrigen Medien erreicht. Für das wesentlich polarere DMP lagen die Werte erheblich schlechter. Eine Verbesserung der Ausbeute konnte durch Aussalzen mit NaCl erzielt werden, wie es Shafik und Enos (1969) angeben. Eine Zugabe von 2 g NaCl auf 5 ml wäßrige Untersuchungslösung reichte für eine Übersättigung aus. Die Ausbeute bei DMP ließ sich dadurch unter sonst gleichen Bedingungen um den Faktor 5 verbessern, die Ausbeute bei DMTP stieg geringfügig. Versuche mit anderen Salzen brachten durchwegs schlechtere Ergebnisse.

Weitere Versuche wurden bezüglich der Wahl des Lösungsmittels angestellt. Sie war allein dadurch eingeschränkt, daß der später zum Nachweis verwendete N-FID-Detektor außer auf Phosphor auch auf Stickstoff und auf Halogene im Molekül besonders stark anspricht. Dadurch kamen eine Reihe gängiger Lösungsmittel wie Methylenchlorid oder Chloroform nicht in Frage. Auch auf das Extraktionsverfahren nach Shafik und Enos (1969) mit einem Ether/Acetonitril-1:1-Gemisch konnte nicht zurückgegriffen werden.

Diethylether als apolares Lösungsmittel bringt wie zu erwarten gute Ausbeuten bei den apolaren Thiophosphaten. Erheblich schlechter dagegen sind die Ausbeuten für das polarere DMP. Deshalb stellten wir einige vergleichende Versuche mit etwas polareren Lösungsmitteln an. So prüften wir die Ausbeuten unter Verwendung von Diethylether, Essigsäureethyl-ester und Ether-Isopropanol-Gemischen (V/V) 92:5:7,5 als Extraktionsmittel unter sonst gleichen Bedingungen.

Der Vergleich zeigte keine signifikanten Verbesserungen der Extraktionsausbeuten durch die polareren Lösungsmittel. Bei gleichzeitigem Zusatz von KH_2PO_4 in der wäßrigen Lösung fanden wir jedoch bei Verwendung von Essigsäureethylester und Ether-Isopropanol-Gemischen eine ca. 10mal höhere Extraktionsrate des Phosphates als bei Verwendung von Diethylether. Die Extraktionsausbeuten an DMP und DMTP wiesen dabei wiederum keinen signifikanten Unterschied auf. Da, wie bereits erläutert (vgl.S. 29), das mitextrahierte Phosphat die gaschromatographische Messung stört, brachte der saure Etherextrakt insgesamt doch die besten Ergebnisse.

4.2. Anzahl der Extraktionsschritte

Die nächsten Versuche wurden bezüglich der Anzahl der Extraktionsschritte angestellt. Bekanntlich werden bei mehrmaligem Ausschütteln mit kleineren Mengen eines Lösungsmittels bessere Ausbeuten erreicht als bei einmaligem Ausschütteln mit einer größeren Menge, was durch Berechnung der Verteilungsgleichgewichte zwischen zwei Phasen leicht zu zeigen ist.

Wir führten folgenden Versuch durch:

Nach drei Extraktionsschritten, wobei jeweils 5 ml wäßrige Standardlösung 1 min mit 10 ml Diethylether ausgeschüttelt wurden, wurde jede Etherfraktion getrennt gemessen. Es zeigte sich, daß bei der Extraktion von DMTP ca. 90 % der insgesamt wiedergefundenen Menge in den Extrakten 1 und 2 und ca. 10 % im dritten Extrakt erhalten waren.

Daraus läßt sich für die gegebenen Bedingungen ein ungefährender Verteilungskoeffizient errechnen:

	wäßrige Phase	Etherphase
1. Schritt	$x - Kx$	Kx
2. Schritt	$(x - Kx) - K(x - Kx)$	$K(x - Kx)$
3. Schritt	$(x - Kx) - K(x - Kx) -$ $KE(x - Kx) - K(x - Kx)$	

$$\frac{Kx + K(x - Kx)}{K(x - Kx) - K(x - Kx)} = \frac{90}{10}$$

$$K_1 = 0,61 \quad (K_2 = 2,9 \text{ nicht brauchbar wegen } 0 < K < 1)$$

Für diesen Verteilungskoeffizienten $K = 0,61$ lassen sich folgende Ausbeuten theoretisch berechnen:

1. Extraktionsschritt	61,0 %
2. Extraktionsschritt	84,8 %
3. Extraktionsschritt	94,1 %
4. Extraktionsschritt	97,7 %
5. Extraktionsschritt	99,1 %

d.h. eine praktisch quantitative Extraktionsausbeute (99 %) wäre bei 5 Extraktionsschritten erreicht.

Obwohl die Extraktionsausbeute bei DMP bei wesentlich niedrigeren Werten liegt, erscheinen mehr als 5 Extraktionsschritte als nicht sinnvoll. Der zeitliche Aufwand wird zu groß, außerdem muß das große Volumen der gesammelten Extraktfraktionen wieder eingeengt werden. Bei diesem Abdampfen des Ethers treten selbst bei schonender Durchführung meßbare Verluste an DMP und DMTP auf, die den Nutzen weiterer Extraktionsschritte in Frage stellen. Eine geringere Zahl von Extraktionsschritten wäre für schnelle qualitative Untersuchungen bereits ausreichend. Bei (halb)-quantitativen und möglichst empfindlichen Analysen führten wir jedoch 5 Extraktionsschritte durch.

Zusammenfassung:

Zur Extraktion werden in einem Zentrifugenglas 5 ml der wäßrigen Untersuchungslösung mit GnHCl bis pH 1 angesäuert und 2 g NaCl in Substanz zugefügt. Dann wird 5mal mit je 10 ml Diethylether 1 min ausgeschüttelt (Verschluß mit Teflonstopfen), bis zur sauberen Phasentrennung kurz zentrifugiert und die Etherphase quantitativ abgehoben. Die Etherextraktfraktionen werden in einem Schliffkolben gesammelt.

4.3. Einengen des Extraktes

Unter der Annahme 100 %iger Ausbeute hätte bei der bisher beschriebenen Extraktion eine Verdünnung um den Faktor 10 stattgefunden. Zur Erreichung guter Nachweisempfindlichkeit müßte aber eine Anreicherung, keinesfalls eine Verdünnung der nachzuweisenden Substanzen angestrebt werden. Dazu mußte ein Verfahren gefunden werden, bei dem die Verluste dieser Substanzen beim Einengen so gering wie möglich gehalten werden.

Nach Fischer und Klingelhöller (1961) könnte der Ether im Abzug in einer Abdampfschale einfach abgeraucht werden. Dabei darf auf keinen Fall erwärmt werden, da sonst meßbare Verluste an DMTP etc. auftreten. Wir fanden jedoch, daß durch die entstehende Verdunstungskälte sich in der offenen Abdampfschale relativ viel Kondenswasser bildet. Zum Trocknen des Extraktes wird dann sehr viel Na_2SO_4 (wasserfrei) benötigt. Es ist praktisch unmöglich, den Extrakt auf ein definiertes Endvolumen einzuengen oder auch nur quantitativ in ein graduiertes Gefäß zu überführen.

Als weitere Möglichkeit kam das Einengen des Extraktes unter sanftem N_2 -Strom in Betracht, wie es Shafik und Enos (1969) angeben. Dieses Verfahren läßt sich sehr kontrolliert anwenden und ermöglicht, den Extrakt auf ein definiertes Endvolumen zu bringen. Leider dauert es bei den vorliegenden Volumina von 50 ml unverhältnismäßig lange, bis ein gewünschtes Endvolumen in der Größenordnung von 0,5 - 1 ml erreicht ist.

Wir modifizierten die Methode dahingehend, daß wir zunächst am Rotationsverdampfer den Extrakt im Schliffkolben weitgehend einengen. Der Rotationsverdampfer bietet den Vorteil des geschlossenen Systems, die nachteilige Ansammlung von Kondenswasser wird vermieden. Es muß auch hier ohne Erwärmen gearbeitet werden. Übermäßige Verdunstungskälte kann durch ein Wasserbad (15 - 20 °C) abgeleitet werden. Das Einengen muß langsam und schonend erfolgen, Siedeverzug ist unbedingt zu vermeiden. Bei derartiger Durchführung konnten zwar im aufgefangenen Ether immer noch Spuren von DMP und DMTP nachgewiesen werden, die Verluste hielten sich aber in akzeptablen Grenzen. Wir engten

den Extrakt auf diese Weise bis auf ca. 0,5 ml ein, was mit etwas Erfahrung auch in 100 ml-Rundkolben abschätzbar ist. Dann wurde der Extrakt quantitativ in ein graduiertes Reagenzglas überführt und der Kolben 2mal mit 2 ml Ether sorgfältig nachgewaschen.

Auf diese Weise erhält man einen bereits weitgehend eingeeengten Extrakt von ca. 4,5 - 5 ml Volumen, der im graduierten Reagenzglas unter sanftem N_2 -Strom weiter auf exakt 0,5 ml eingeeengt werden kann. So hat man unter Annahme einer 100 %igen Extraktionsausbeute gegenüber der ursprünglichen wäßrigen Untersuchungslösung eine Anreicherung der nachzuweisenden Substanzen um den Faktor 10 erreicht. Dieser selbstverständlich variable Faktor wird bei (halb)quantitativen Auswertungen im Rahmen des insgesamt auftretenden Verdünnungsfaktors berücksichtigt.

Durch Aufarbeiten größerer Mengen Untersuchungslösung und anschließendes starkes Einengen des Extraktes kann auf einfache Weise eine erhebliche Anreicherung der zu untersuchenden Substanzen und damit eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden.

4.4. Extraktionsausbeuten

Die Ausbeuten für DMP und DMTP wurden für die beschriebene Extraktion mit anschließender Einengung bestimmt. Dazu wurden Standardlösungen von DMP und DMTP in H_2O nach der beschriebenen Methode extrahiert und die eingeeengten Extrakte methyliert und ethyliert und gaschromatographisch gemessen. Als Vergleich

wurden Standardlösungen von DMP in Ethanol sowie DMTP in Methanol und Ethanol angesetzt, direkt methyliert, zusätzlich ein entsprechender TMP-Standard in Benzol angesetzt und gaschromatographisch gemessen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 13 aufgeführt:

Tabelle 13: Extraktionsausbeuten in % für die Extraktion von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat aus wäßriger Lösung

	DMP	DMTP
Vergleichsstandard:	100,0 %	100,0 %
Messung Nr. 1:	5,7 %	85,9 %
Messung Nr. 2:	5,7 %	114,7 %
Mittelwert	5,7 %	100,3 %

Es zeigte sich eine Übereinstimmung mit den für DMTP aufgrund der Vorversuche theoretisch errechneten Werte für 5 Extraktionsschritte.

Die Kompromißlösung der sehr geringen Extraktionsausbeute bei DMP von ca. 6 % im Verhältnis zur praktisch quantitativen Extraktion von DMTP und DETP aus wäßriger Lösung und zur Extraktionsausbeute von ca. 80 % bei DEP war bedingt einerseits durch die

aus technischer Sicht eingeschränkte Auswahl von Lösungsmitteln (s.S.114ff), zum anderen durch die Forderung, ein möglichst einfaches, auf alle in Frage kommenden Dialkyl(thio)phosphate anwendbares Extraktionsverfahren zu erarbeiten. Neben anderen Autoren weisen vor allem Blair und Roderick (1976) auf die spezielle Problematik der Extraktion von DMP aus wäßrigen Lösungen hin. Ein gesondertes Extraktionsverfahren für DMP aus wäßriger Lösung bzw. der Einsatz von Ionenaustauschern oder Vorfraktionierung mittels Säulenchromatographie würde das Verfahren erheblich in die Länge ziehen und damit im Widerspruch zu der anfangs geforderten Zumutbarkeit von zeitlichem Aufwand und Arbeitsaufwand für ein allgemeines Screening stehen. Hierzu müssen sicherlich weitere Untersuchungen angestellt werden, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würden.

Aufgrund der Problematik der Peakausmessung und einer Reihe weiterer Faktoren, die die Präzision und Reproduzierbarkeit unserer Messungen beeinträchtigten (z.B. Konstanthaltung der Meßbedingungen bei der Gaschromatographie, Einspritzmengen, Abmessung der Volumina bei der Alkylierung etc.) erscheint es nicht sinnvoll, die aufgrund einer kleinen Zahl von Messungen erhaltenen Mittelwerte (s.Tab.13) für exakte quantitative Berechnungen zugrunde zu legen. Für halbquantitative Aussagen sind sie jedoch hilfreich. Wir benutzten für derartige Abschätzungen die Annahme einer praktisch quantitativen Ausbeute, d.h. 100 %, für DMTP und DETP, einer ca. 80 %igen Ausbeute für DEP und einer ca. 6 %igen Ausbeute für DMP.

5. Aufarbeitung von biologischem Untersuchungsmaterial

5.1. Extraktion von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat aus biologischem Material

5.1.1. Anwendbarkeit des Extraktionsverfahrens für wäßrige Lösungen auf verschiedenartiges biologisches Material

Die oben beschriebene Extraktionsmethode ist für unbehandelte sowie für alkalisch hydrolysierte (s.S.128 f) Harn-, Serum- und Vollblutproben ohne weitere Vorbehandlung erprobt worden. In allen Fällen war die praktische Anwendung problemlos.

Bei der Aufarbeitung von Serum oder Vollblut zeigte sich, daß es von Vorteil ist, die Probe vor Extraktion bzw. vor der alkalischen Hydrolyse 1:1 (V/V) mit H_2O bidest. zu verdünnen. Das Ausschütteln mit Ether wird erleichtert und beim anschließenden Zentrifugieren die Phasentrennung wesentlich schneller erreicht. Dadurch wird unnötig langer Kontakt des Extraktes mit der stark sauren wäßrigen Phase vermieden, wie es Shafik und Enos (1969) empfehlen.

Eine Enteiweißung der Serumproben erwies sich als überflüssig. Sie würde nur zusätzlich Probleme bereiten, da z.B. die übliche Fällung mit Trichlor-essigsäure (TCA) wegen der Cl -Empfindlichkeit des Detektors nicht möglich ist. Vollblutproben konnten unbehandelt weiterverarbeitet werden, es erwies sich nicht als notwendig, das Serum zur Weiterverarbeitung abzutrennen. Dies ist dann von Bedeutung, wenn nur sehr kleine Volumina für die Analyse zur Verfügung stehen.

Eine spezielle Form der Anwendung ist für Hämoresin-Kapseln, wie sie zur Hämo-perfusion verwendet werden, denkbar. Von den Kapselinhalten wird ein Aceton-extrakt hergestellt, der die adsorbierten Alkyl-phosphatester enthält. Dieser wird 1:1 (V/V) mit H_2O bidest. verdünnt, zur Spaltung der Alkyl-phosphatester verseift (s.S.128 f) und anschließend extrahiert wie oben ausgeführt.

Durch Extraktionsversuche an normalen Harn-, Blut- und Serumproben und an mit DMP und/oder DMTP in Substanz versetzten Proben konnte gezeigt werden, daß in keinem Fall andere, mitextrahierte Substanzen, z.B. Fettsäuren etc., den DMP- bzw. DMTP-Nachweis stören. Kleinere Störpeaks traten bei der gaschromatographischen Messung im empfindlichsten Meßbereich zwar auf, sie stammten zum größten Teil jedoch aus dem Alkylierungsreagens für die Derivatisierung, was sich durch die gaschromatographische Kontrolle dieses Reagenzes leicht zeigen ließ (vgl. S. 36). Die wenigen, in den Extrakten zusätzlich auftretenden störenden Substanzen bieten keine Verwechslungsgefahr mit den gesuchten Substanzen und äußern sich praktisch nur im empfindlichsten Meßbereich in einer unruhigen Nulllinie.

Die einzige Ausnahme stellt das organische Phosphat dar, das aus Harn, Blut und Serum durch den Ether-extrakt in geringen Mengen mitextrahiert wird. Auf dieses Problem wurde bereits mehrfach hingewiesen. An dieser Stelle sei nur gesagt, daß sich der Übergang kleinerer Mengen Phosphat in den Extrakt praktisch nicht vermeiden läßt und der Ether-extrakt sich im Vergleich zu anderen Extraktionsmitteln gerade in dieser Hinsicht als optimal erwies (s.S. 114 ff).

Bei der Durchführung der Methylierung bzw. Ethylierung für die Gaschromatographie ist noch zu beachten, daß das Vorhandensein anderer, ebenfalls alkylierbarer Substanzen im Extrakt, wie z.B. Fettsäuren, manchmal einen höheren Verbrauch an Diazomethan oder Diazoethan erforderlich machen als in der ursprünglichen Arbeitsvorschrift (s.S.34 f) vorgesehen. Wie bereits beschrieben, muß dann so lange Diazomethan- bzw. Diazoethan-Reagens zugesetzt werden, bis die bleibende Gelbfärbung schließlich einen Überschuß zeigt.

Schwierigkeiten ergeben sich manchmal bei stark gefärbten Extrakten, wo das einfache Kriterium für den Reagensüberschuß, die Gelbfärbung, nicht beobachtet werden kann. Hier ist besonders auf die Gasentwicklung zu achten und in Zweifelsfällen besser mehr Reagens zuzugeben. Bei (halb)quantitativer Auswertung muß dabei immer der auftretende Verdünnungsfaktor beachtet werden.

5.1.2. Extraktionsausbeuten

Zur Untersuchung der Extraktionsausbeuten aus Urin wurden in Harnproben klinisch gesunder Versuchspersonen, die keiner Belastung mit Alkylphosphaten ausgesetzt waren, definierte Mengen DMP und DMTP (jeweils als NH_4^+ -Salz, 90 %ig) eingewogen. Die so erhaltenen Harnproben mit definierten DMP- und DMTP-Konzentrationen wurden nach der erarbeiteten Vorschrift (s.S.114 ff) extrahiert, die eingeeengten Extrakte ethyliert und gaschromatographisch gemessen. Eine "Leerkontrolle" der Harnproben vor Einwaage der Dialkylphosphate ergab bei gleicher Aufarbeitung keine störenden Substanzen im Chromatogramm.

Zum Vergleich wurden Standardlösungen von DMP und DMTP (jeweils NH_4^+ -Salz, 90 %ig) in H_2O dest. hergestellt und in der gleichen Weise extrahiert, ethyliert und gaschromatographisch gemessen. Dabei zeigten sich in keinem Fall signifikante Unterschiede zwischen den Chromatogrammen der Harnextrakte und denen der Extrakte von wäßrigen Standardlösungen gleicher DMP- und DMTP-Konzentrationen. Es darf daher angenommen werden, daß die für wäßrige Standardlösungen von DMP und DMTP ermittelten Extraktionsausbeuten (s.S.120 f) auch auf die Extraktion aus Urin übertragbar sind.

Für die Extraktion von DMP und DMTP aus anderen biologischen Untersuchungsmaterialien, z.B. Blut, Serum, Mageninhalt etc., wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Extraktionsausbeuten bestimmt. Es sei hier nur auf die Ergebnisse von Shafik und Enos (1969) verwiesen, die bei ihren Untersuchungen über die Wiederfindungsraten von Dialkylphosphaten, ausgehend von wäßriger Lösung, Urin und Serum, keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Art des untersuchten Ausgangsmaterials feststellten. Für die Durchführung von quantitativen Analysen wäre allerdings eine genaue Ausbeutenbestimmung unerlässlich.

5.1.3. Nachweisgrenzen bei der Analyse von biologischem Material

Die im Rahmen der Erstellung von Eichkurven durchgeführten Abschätzungen ergaben bei der gaschromatographischen Trennung Nachweisgrenzen von ca. 0,1 - 0,5 ng der alkylierten Derivate von DMP und DMTP. Dies entspricht in der Größenordnung der von Askew et al. (1969) und Shafik et al. (1969, 1973) angegebenen

Werten, wobei noch zu beachten ist, daß dabei unterschiedliche Detektorsysteme zur Anwendung kamen.

Unter Zugrundelegung einer realistischen Einspritzmenge von 1 - max. 5 µl bei der gaschromatographischen Messung läßt sich bezüglich der Konzentration von DMP bzw. DMTP im untersuchten Ansatz eine Nachweisgrenze von ca. 0,1 µg/ml errechnen. Berücksichtigt man, daß im Rahmen des Extraktionsverfahrens noch eine vorherige Anreicherung um den Faktor 10 - 20 möglich ist, kann man eine Nachweisgrenze von ca. 0,01 µg/ml bezogen auf die Konzentration von DMTP und eine Nachweisgrenze von ca. 0,15 µg/ml bezogen auf die Konzentration von DMP (Extraktionsausbeuten!) im zu untersuchenden Asservat annehmen. Praktisch bedeutet das z.B., daß in einer 5 ml-Probe Urin 50 ng DMTP oder 750 ng DMP gerade noch nachgewiesen werden können.

Ein Versuch, diese Nachweisgrenzen durch weitere Maßnahmen im Sinne von Shafik et al. (1971), Daughton et al. (1976), Lores und Bradway (1977) oder Blair und Roderick (1976) zu verbessern, wurde nicht unternommen. Der zusätzliche Einsatz von Ionenaustauschern oder Vorfraktionierung durch Säulenchromatographie drohte das Verfahren erheblich in die Länge zu ziehen, was im Widerspruch zu der anfangs geforderten Zumutbarkeit von zeitlichem Aufwand und Arbeitsaufwand stand. Außerdem erscheint die Wirksamkeit derartiger Maßnahmen zur Steigerung der Empfindlichkeit in Frage gestellt, solange nicht die Störsubstanzen aus dem Alkylierungsreagens zu eliminieren sind. Hierzu könnten weitere Untersuchungen angestellt werden, die jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten würden.

5.2. Verseifung von nichtmetabolisierten Alkylphosphorsäureestern

Während Dialkylphosphate nach Extraktion aus der wäßrigen Phase mit der beschriebenen Methode direkt für die gaschromatographische Trennung derivatisiert werden können, ist dies für ihre Ester, die insektiziden Alkylphosphatverbindungen nicht möglich. Im Rahmen eines allgemeinen Screening-Verfahrens interessieren aber sowohl die Metaboliten DMP und DMTP wie auch das Insektizid selbst, das z.B. im Mageninhalt bei oraler Aufnahme und nach Resorption auch im Blut oder in Organen vorliegt.

5.2.1. Methode

Wie bereits erwähnt, sind die in Frage kommenden Insektizide Ester der Dimethylphosphorsäure, -thiophosphorsäure oder -dithiophosphorsäure. Sie müssen in geeigneter Weise verseift werden, so daß man DMP und DMTP und einen weiteren, für das jeweilige Insektizid spezifischen Rest erhält. Eine Methode hierzu beschreiben Fischer und Klingelhöller (1961). Sie kochen die Untersuchungsmaterialien wie Mageninhalt, Blut, Harn, Liquor und Organextrakte mit 15 % KOH und Ethanol 3 Stunden am Reichflußkühler.

Bei Erprobung und Modifizierung des Verfahrens stellte sich heraus, daß es bei gleichbleibend guten Ergebnissen wesentlich einfacher ist, eine kleine Probe des Untersuchungsmaterials (5 ml) mit 0,5 g KOH in Substanz (entsprechend 2 Plätzchen) zu versetzen und bei 90 °C im Wasserbad 90 min lang zu verseifen. Dies kann direkt in dem Zentrifugenglas erfolgen, in dem

später auch die Extraktion durchgeführt wird, mit einem locker sitzenden Teflonstopfen als Verschuß. Danach läßt man abkühlen und neutralisiert mit 6 n HCl. Die so erhaltene verseifte Probe kann dann wie beschrieben extrahiert werden.

Serum oder Vollblut kann man zweckmäßigerweise vor der Verseifung 1:1 (V/V) mit H_2O bidest. verdünnen, was die weitere Verarbeitung erleichtert. Ebenfalls verdünnt werden müssen Acetonextrakte, z.B. von Hämoresinkapselinhalten nach Hämo-perfusion. Hier verdampft das Aceton während der Verseifungsprozedur, so daß am Ende nur das zur Verdünnung eingesetzte H_2O -Volumen zurückbleibt, das sich problemlos wie die anderen wäßrigen Untersuchungssubstanzen weiterverarbeiten läßt.

5.2.2. Ausbeuten

Die Ausbeuten bei der Verseifung sind für die einzelnen Insektizide unterschiedlich und müssen bei quantitativen Analysen jeweils mit einem Vergleichsstandard bestimmt werden. Beispielhaft wurde die Ausbeute bei der Verseifung von Metasystox R (Demeton-S-methyl-sulfoxid, 50 %iges Emulsionskonzentrat) bestimmt. Unter den genannten Bedingungen (5 ml wäßrige Lösung + 0,5 g KOH, 90 min bei 90 °C) ergab sich eine praktisch quantitative Ausbeute beim Vergleich mit einem DMTP-Standard. Die bei 4 Messungen von DMTP in verseiften Metasystox R-Ansätzen gefundenen Werte zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14: Ausbeuten bei der Verseifung von
Metasystox R

Vergleichsstandard:	100,0 %
Messung Nr. 1:	115,9 %
Messung Nr. 2:	72,8 %
Messung Nr. 3:	106,7 %
Messung Nr. 4:	119,2 %
Mittelwert:	103,6 %

Auf die Problematik der relativ geringen Präzision wurde bereits eingegangen.

Gute Verseifungsausbeuten sind für die meisten in Frage kommenden Insektizide zu erwarten. Eine Abschätzung des jeweiligen Verhaltens ist anhand von Angaben über die Beständigkeit der einzelnen Verbindungen im alkalischen Medium möglich, wie sie z.B. bei Schrader (1963) und bei Perkow (1979) für viele Insektizide zu finden sind.

Die Verseifungszeit und -temperatur wurden aus Sicherheitsgründen relativ hoch gewählt. Vorversuche brachten z.B. bei methyl-Paraoxon bereits nach der halben Zeit gleich gute Ergebnisse. Für eine qualitative Schnellmethode ist es daher möglich, die Verseifungszeit erheblich kürzer zu wählen. Bei leicht verseifbaren Insektiziden wären dann 10 - 15 min ausreichend. Es ist aber nicht auszuschließen, daß andere Verbindungen drastischere Verseifungsbedingungen erforderlich machen, die Richtwerte sind also gegebenenfalls zu modifizieren.

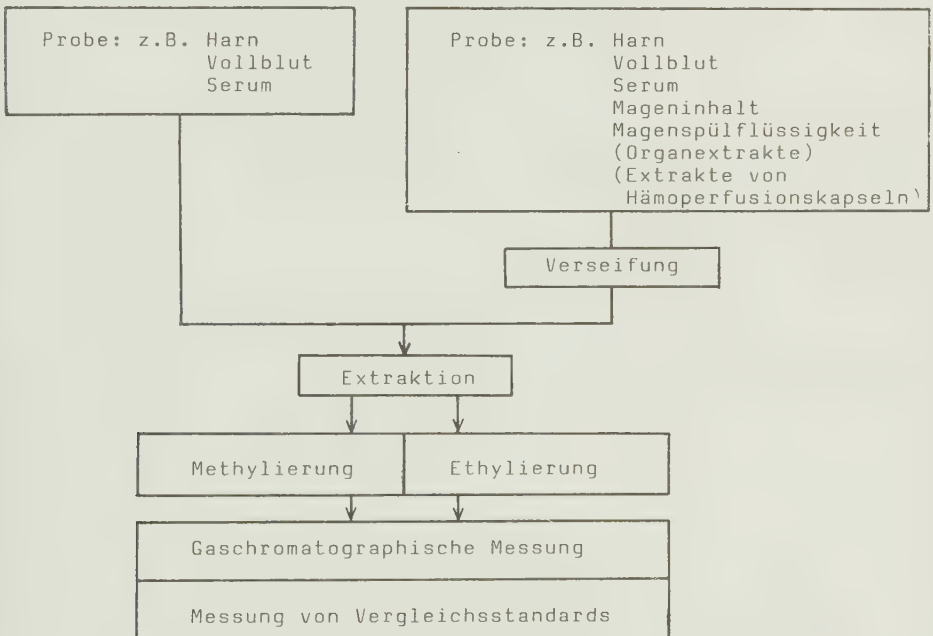
6. Zusammenfassende Darstellung der Methode

Auf den folgenden Seiten ist der Arbeitsablauf bei der Analyse von biologischem Untersuchungsmaterial nochmals als Schema zur besseren Übersicht zusammengefaßt:

ALLGEMEINER ARBEITSGANG

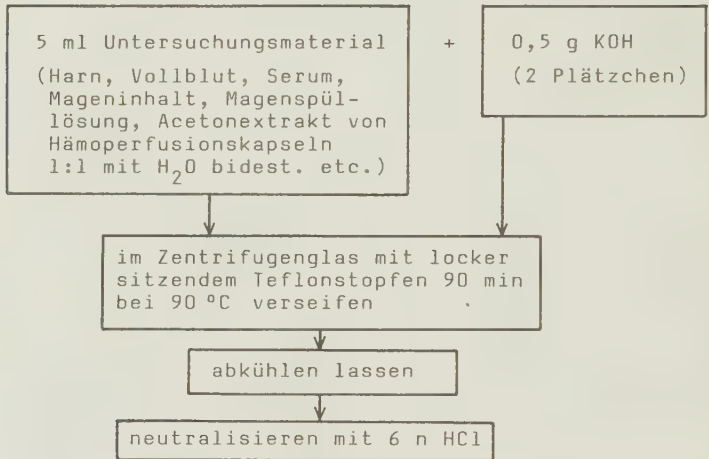
bei Prüfung auf DMP und
DMTP:

bei Prüfung auf nicht metabolisierte
Insektizide:



6.1. Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial

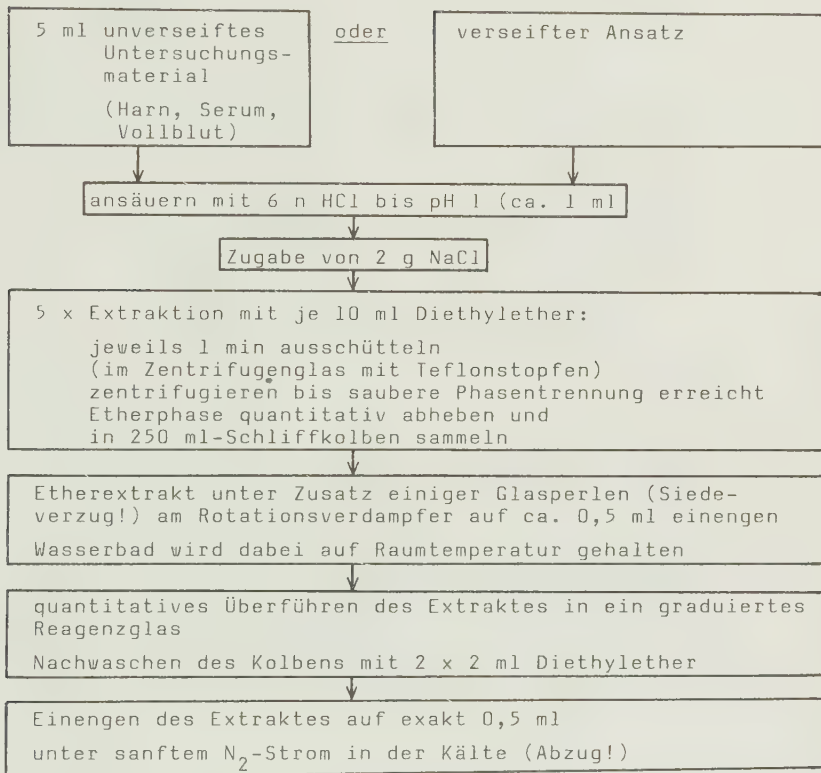
6.1.1. Verseifung



6.1.2. Extraktion

bei Prüfung auf DMP und
DMTP:

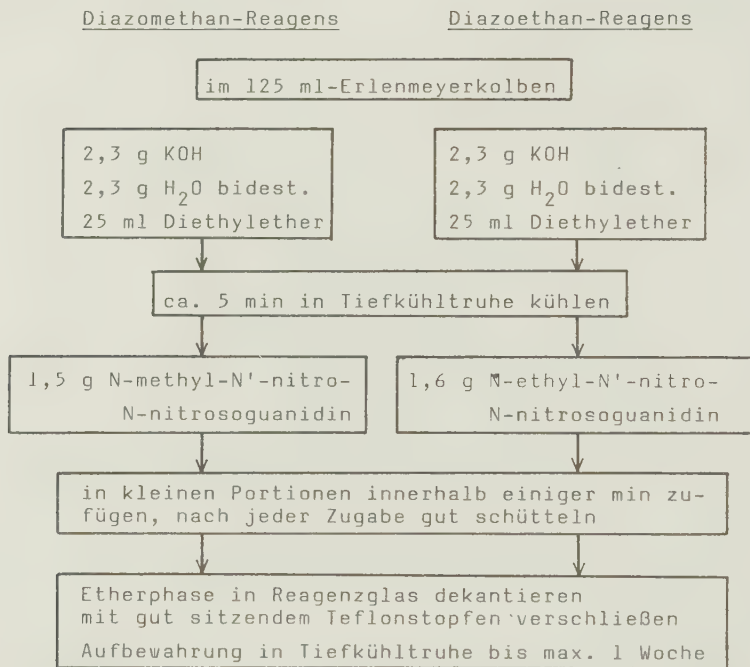
bei Prüfung auf nicht me-
tabolisierte Insektizide:



- Anmerkungen:
- Die Aufarbeitung größerer oder kleinerer Mengen des Untersuchungsmaterials erfolgt analog, wobei das Verhältnis aller eingesetzten Substanzmengen gewahrt werden muß.
 - Das Ausmaß der Konzentrierung durch Einengen des Extraktes kann je nach den zu erwartenden Konzentrationen variiert werden.

6.1.3. Methylierung und Ethylierung

Darstellung des Reagenzes



Achtung: Im Abzug arbeiten!

Schutzhandschuhe, Schutzbrille, evtl. Atem-
schutz verwenden!

Keine Schliffgläser, keine verkratzten oder
angeätzten Glaswaren verwenden, sonst
Explosionsgefahr!

Alkylierungsreaktion

Methylierung

100 µl Extrakt
20 µl Methanol
200 µl Diazomethan-Reagens^{x)}

Ethylierung

100 µl Extrakt
20 µl Ethanol
200 µl Diazoethan-Reagens^{x)}

↓
30 min im Abzug stehen lassen

↓
Zugabe von
1 Tropfen HCOOH (98 - 100 %)

^{x)} Falls nach Zugabe von 200 µl Diazoalkan-Reagens noch Gasentwicklung und Entfärbung auftritt, muß weiter Diazoalkan-Reagens in definierten Mengen zugegeben werden, bis eine bleibende Gelbfärbung den Reagensüberschuß anzeigt (Verdünnungsfaktor berücksichtigen!).

6.2. Gaschromatographische Messung der alkylierten Extrakte

Im folgenden Abschnitt sind die Gerätedaten für die gaschromatographische Messung kurz zusammengestellt:

Gerätetyp:	HP 5750 G Hewlett-Packard Research Chromatograph
Detektor:	N - FID
Trennsäule:	10 % Carbowax 20 M auf Chromosorb W HP (AW-DMCS) 80/100 Glassäule 1,80 m / Innendurchmesser 3 mm
Gasströme:	Helium (Carrier) 40 ml/min H ₂ 29 ml/min Synthet. Luft 250 ml/min
Temperaturen:	Einspritzblock 170 °C Trennsäule 120 °C Detektorblock 370 °C
Meßbereiche:	Range 10 ³ /Attenuation 4 für Konzentrationen von ca. 1 µg/ml Range 10 ⁴ /Attenuation 4 für Konzentrationen von ca. 10 µg/ml Range 10 ⁵ /Attenuation 4 für Konzentrationen von ca. 100 µg/ml
Einspritz- volumina:	0,5 - 5 µl

Retentionszeiten:

Da die Temperaturen und Gasströme nicht optimal konstant zu halten waren, wiesen auch die Retentionszeiten der zu trennenden Verbindungen geringfügige tagesabhängige Schwankungen auf. In der folgenden Tabelle (Tab. 15) sind als Beispiel Tagesretentionszeiten angegeben, die sich auf die zum Vergleich bestimmten Standardretentionszeiten für TMP und TEP beziehen:

labelle 15: Beispiel für Tagesretentionszeiten der alkylierten Dialkylphosphate
(bezogen auf t_{ret} für TMP = 4'10"
 r_{ret} für TEP = 5'46")

	DMTP(I)	DETP(I)	DMP	DEP	DMTP(II)	DETP(II)
methyliert	3'04"	3'38"	4'10"	5'16"	11'03"	13'07"
ethyliert	3'19"	3'53"	4'43"	5'46"	12'17"	14'15"

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für die Trennung von DMP, DEP, DMTP und DETP, wobei die Konzentrationen aller vier Substanzen in der gleichen Größenordnung liegen. Die Aufzeichnung erfolgte von rechts nach links, der Papiervorschub betrug 0,5 cm/min. Eine Einheit der Schreiberpapierskala entspricht einer Laufzeit von 2 min.

Abbildung 26 zeigt die Trennung des Substanzgemisches im methylierten Ansatz, Abbildung 27 die Trennung des gleichen Substanzgemisches im ethylierten Ansatz.

Abbildung 26:

Trennung von Dimethylphosphat (DMP), Diethylphosphat (DEP)
Dimethylthiophosphat (DMTP) und Diethylthiophosphat (DETP)
im methylierten Ansatz

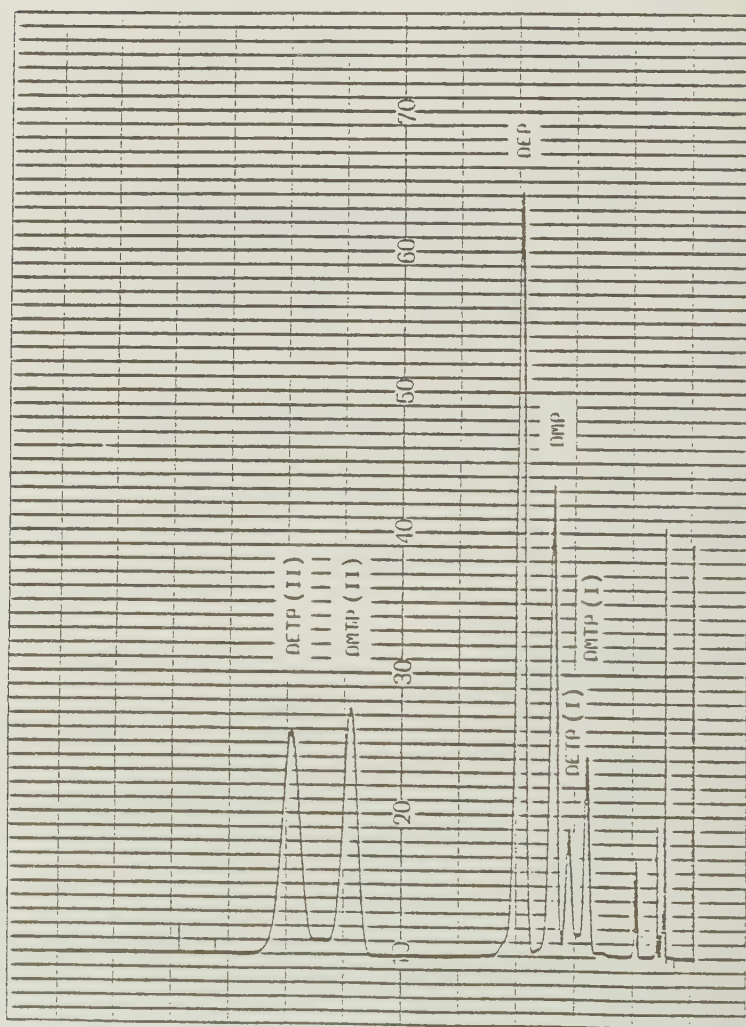
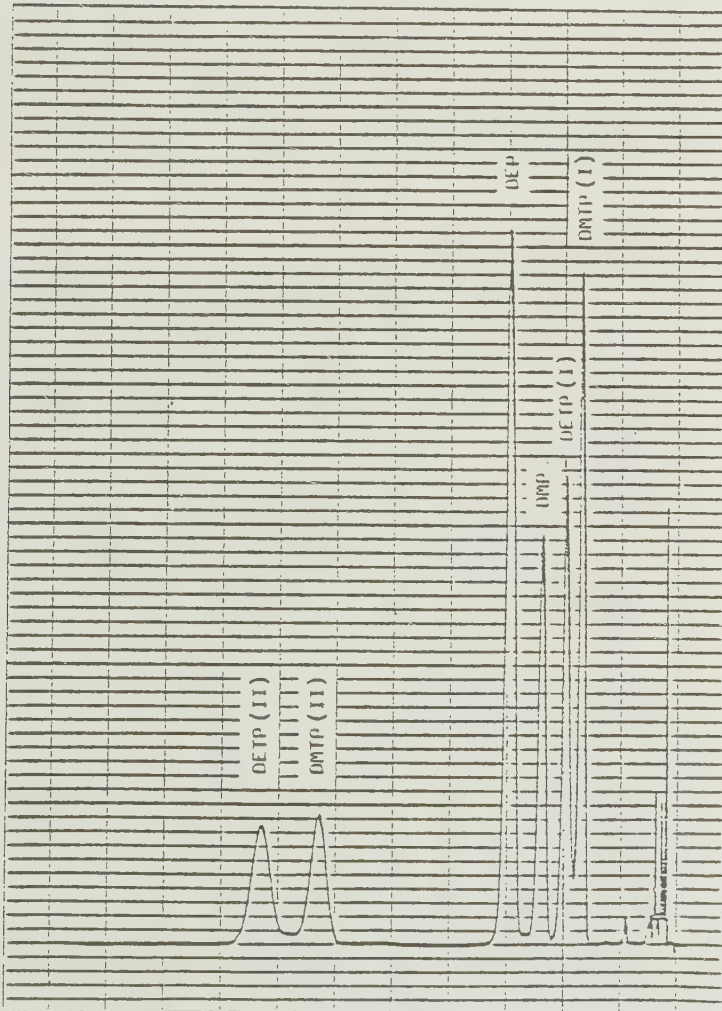


Abbildung 27:

Trennung von Dimethylphosphat (DMP), Diethylphosphat (DEP),
Dimethylthiophosphat (DMTP) und Diethylthiophosphat (DETP)
im ethylierten Ansatz



6.3. Modifikation als qualitative Schnellmethode bei Verdacht auf Vergiftung mit Phosphorsäureestern

Beim Verdacht auf eine akute Alkylphosphatvergiftung ist es oft nicht notwendig, alle Möglichkeiten der Methode bezüglich Empfindlichkeit oder (halb)quantitativer Aussagefähigkeit voll auszuschöpfen. Vielmehr interessiert eine möglichst schnell zu treffende qualitative Aussage über das Vorhandensein von Dialkylphosphaten im zu untersuchenden Asservat. Für solche Fälle kann die Methode als Schnellverfahren wie folgt modifiziert werden:

(1) Verseifung

5 ml Untersuchungsmaterial werden mit 2 Plätzchen KOH im Zentrifugenglas bei 90 °C (im Wasserbad) je nach Möglichkeiten und Voraussetzungen 5 - 90 min verseift, anschließend wird mit 6 n HCl neutralisiert.

(2) Extraktion

Die Extraktion erfolgt analog zur ausführlichen Methode, evtl. mit nur 3 - 4 Extraktionsschritten, bis zum Einengen des Extraktes am Rotationsverdampfer auf ca. 0,3 - 0,5 ml. Je 100 µl davon werden direkt methyliert bzw. ethyliert.

Bei hohen zu erwartenden Werten genügt eventuell auch ein einmaliges Ausschütteln mit Ether.

(3) Methylierung und Ethylierung

Die Derivatisierung erfolgt analog zur ausführlichen Methode, jedoch nur mit 5 - 10 min Reaktionszeit.

(4) Gaschromatographische Trennung

Die Messung erfolgt grundsätzlich im empfindlichsten Meßbereich, nur bei zu großem Schreiberausschlag wird auf unempfindlichere Meßbereiche umgeschaltet.

6.4. Zeitbedarf

Unter Berücksichtigung der reinen Retentionszeiten und der zusätzlich benötigten Arbeitszeiten kann für die Aufarbeitung einer Probe biologischen Untersuchungsmaterials folgender Zeitbedarf abgeschätzt werden (Tab. 16):

Tabelle 16: Zeitbedarf von Schnellmethode und regulär durchgeführter Methode im Vergleich

	Schnellmethode	Ausführliche Methode
Verseifung	5 - 90 min	90 min
Extraktion	5 - 20 min	30 min
Alkylierung	10 - 15 min	35 min
GC-Messung	40 min	40 - 90 min
Zeitbedarf insgesamt:	1 - 2 3/4 Std.	3 1/4 - 4 Std.

Bei der Aufarbeitung ist eine Zeiteinsparung durch Serienansätze möglich. Limitierender Zeitfaktor bleibt die gaschromatographische Messung.

7. Lagerversuche

7.1. Problematik der Lagerung von Proben

Comer et al. (1976), die die Stabilität von Parathion-Metaboliten in Urinproben einiger vergifteter Personen verfolgten, kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, daß die meßbaren Konzentrationen an DETP, zum Teil aber auch DEP, im Verlauf von einigen Tagen bis zu 6 Wochen stark abfallen, und zwar sowohl bei Lagerung bei Raumtemperatur als auch bei tiefgekühlten Proben. Auch an einer wäßrigen DETP-K⁺-Lösung zeigten sie, daß die gemessenen Konzentrationen nach 2 Wochen Lagerung nur noch ca. 15 - 20 % des Ausgangswertes betragen. Daraus ergeben sich zwei Konsequenzen:

- (1) Wäßrige DETP-K⁺-Standardlösungen können nicht aufbewahrt werden
- (2) Urinproben bei Vergiftungen sollten so schnell wie möglich, sicher nicht später als eine Woche nach Abnahme analysiert werden.

Punkt (1) trugen wir Rechnung, indem wir die wäßrigen Standardlösungen aller verwendeten Dialkyl(thio)-phosphate stets frisch ansetzten. Bei Untersuchung der Verdünnungen von Trialkylphosphaten in Benzol fanden wir, daß diese bei Aufbewahrung in geeigneten Gefäßen, z.B. Schliffgläsern, die ein Verdunsten des Lösungsmittels verhindern, über Wochen stabil waren.

Punkt (2) ist für die Messung klinischer Fälle von entscheidender Bedeutung: Zum einen ist es nicht immer möglich, die Proben sofort zu messen, da oft schon Tage vergehen, bis die in der Klinik gewonnenen Proben in ein Labor gelangen, das über die nötigen Meßein-

richtungen verfügt. Für exakte quantitative Analysen müßten die Proben aber sofort nach Abnahme gemessen werden. Speziell in unserem Fall war es nicht möglich, die im Labor eingetroffenen Proben immer sofort zu messen, da sich die Methode noch im Versuchsstadium befand. In den meisten Fällen konnten nur die nach den gängigen Analysen noch verbleibenden Asservat-Reste aufgearbeitet werden. Außerdem sollten auch länger zurückliegende Fälle, von denen Asservatreste noch tiefgekühlt vorhanden waren, gemessen werden.

7.2. Versuchsdurchführung

Comer et al. (1976) führten ihre Studie nur mit wenigen Urinproben von Einzelfällen durch. Analoge Untersuchungen konnten wir mangels ausreichender Proben von aktuellen Vergiftungen nicht durchführen. Um die Problematik etwas genauer zu studieren, führten wir Lagerversuche mit Harnproben durch, die zugesetztes DMP und DMTP in bekannten Mengen enthielten (daneben auch DEP und DETP, die aber hier nicht näher diskutiert werden sollen). Dabei wurde Urin von klinisch gesunden Versuchspersonen verwendet, die keiner Belastung mit Alkylphosphaten ausgesetzt waren.

Nach Abnahme der Harnproben wurden DMP und DMTP jeweils als NH_4^+ -Salz (90 %ig) eingewogen:

Harn 1: 500 ml Harn
 635 mg DMP
 124 mg DMTP- NH_4^+
 Ausgangskonzentrationen
 1 mg/ml DMP
 200 µg/ml DMTP

Harn 2: 1000,0 ml Harn
 63,5 mg DMP
 12,4 mg DMTP
 Ausgangskonzentrationen
 50 µg/ml DMP
 10 µg/ml DMTP

Die Harnproben wurden bei drei verschiedenen Lager-
temperaturen aufbewahrt. Dazu wurde je ein Drittel
der Proben bei Raumtemperatur (ca. 20 °C), im Kühl-
schrank (ca. 4 °C) und in der Tiefkühltruhe (-18 °C)
gelagert. Die bei -18 °C aufbewahrten Proben wurden
bereits in 5 ml-Portionen eingefroren, wie sie für
die Messung benötigt wurden.

Die Messung erfolgte nach der Grundmethode für un-
verseifte Harnproben (s.S. 131 ff), es wurden jeweils
5 ml Probe verarbeitet. Die drei verschiedenen gelagerten
Proben gleicher Ausgangskonzentration wurden stets in
Serie am gleichen Tag gemessen. Die DMP- und DMTP-
Konzentrationen in Harnprobe 1 wurden über 24 Tage,
in Harnprobe 2 über 21 Tage verfolgt.

7.3. Auswertung

Bei der Auswertung wurden die am Tag der Einwaage
(Tag 0 = Start) gefundenen Peakflächen entsprechend
den Reinsubstanzkonzentrationen 1 mg/µl und 200 µg/ml
bzw. 50 µg/ml und 10 µg/ml für jeweils DMP und DMTP
festgehalten, ebenso der Trialkylphosphat-Vergleichs-
standard. Bei jeder späteren Messung wurden die Peak-
flächen über den mitgeführten Trialkylphosphat-Standard
auf die Detektorempfindlichkeit vom Tag 0 zurückge-
rechnet und die entsprechenden Konzentrationen berechnet.

Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Peakhöhe und Substanzmenge vorausgesetzt, was für die Substanzmengen, die bei der gaschromatographischen Messung eingesetzt wurden, zulässig war.

Zur Kontrolle wurden am Tag 0 als "Leerwert" 5 ml der abgenommenen Harnprobe ohne Einwaage von Dialkyl-(thio)phosphaten im empfindlichsten Meßbereich untersucht. Dabei wurden keine Störpeaks außer den aus dem Alkylierungsreagens bekannten beobachtet.

7.3.1. Lagerversuch "Harn 1"

Die im Verlauf des 24-tägigen Lagerversuches gemessenen DMP- und DMTP-Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 17) aufgelistet.

Tabelle 17: Ergebnisse des 24-tägigen Lagerversuches
mit "Harn 1"
(alle Meßwerte sind Konzentrationsan-
gaben in µg/ml)

Tag:	0	2	4	7	10	21	24	
	Start						Ende	
20 °C								
DMP	1000	939,4	727,2	696,9	812,2	742,4	696,9	69,7 %
DMTP	200	199,9	131,0	124,1	124,1	110,3	93,1	46,6 %
4 °C								
DMP	1000	1015,1	996,6	651,5	621,2	575,7	681,8	68,2 %
DMTP	200	217,2	137,9	131,0	131,0	99,9	79,3	39,6 %
-18 °C								
DMP	1000	893,9	909,1	757,5	757,5	469,7	499,9	50,0 %
DMTP	200	210,3	134,5	124,1	137,9	82,7	72,4	36,2 %

Die letzte Spalte in Tabelle 17 gibt die bei Versuchs-
ende noch gefundene Konzentration in % des Ausgangs-
wertes an.

Durchschnittswerte:

DMP nach 24 Tagen 63 %

DMTP nach 24 Tagen 41 %

In den folgenden Abbildungen (Abb. 28 und 29) sind die gemessenen DMP- bzw. DMTP-Konzentrationen im Verlauf dieses Lagerversuches über 24 Tage graphisch dargestellt:

Abbildung 28:

Verlauf der DMP-Konzentration im Lagerversuch "Harn 1"

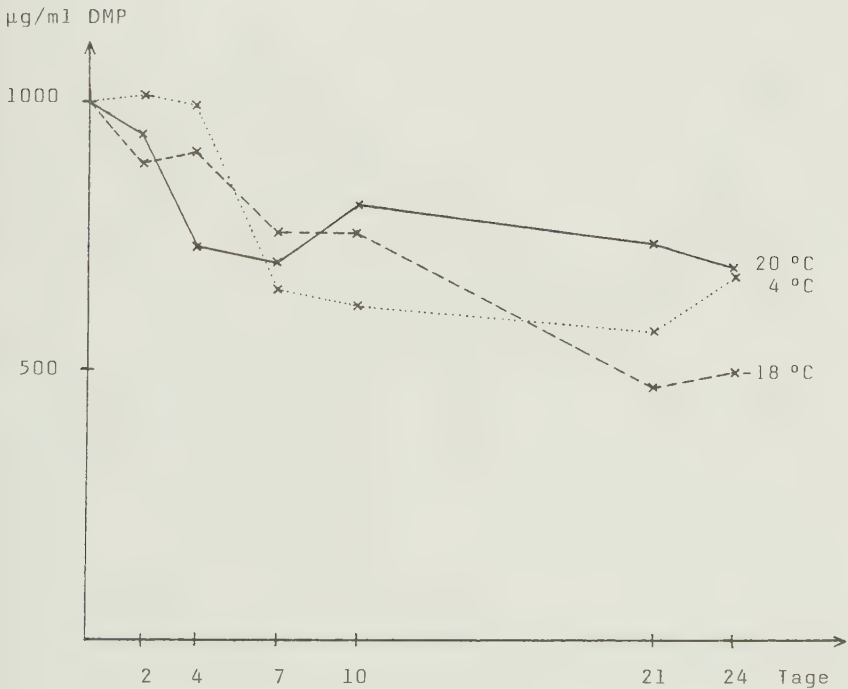
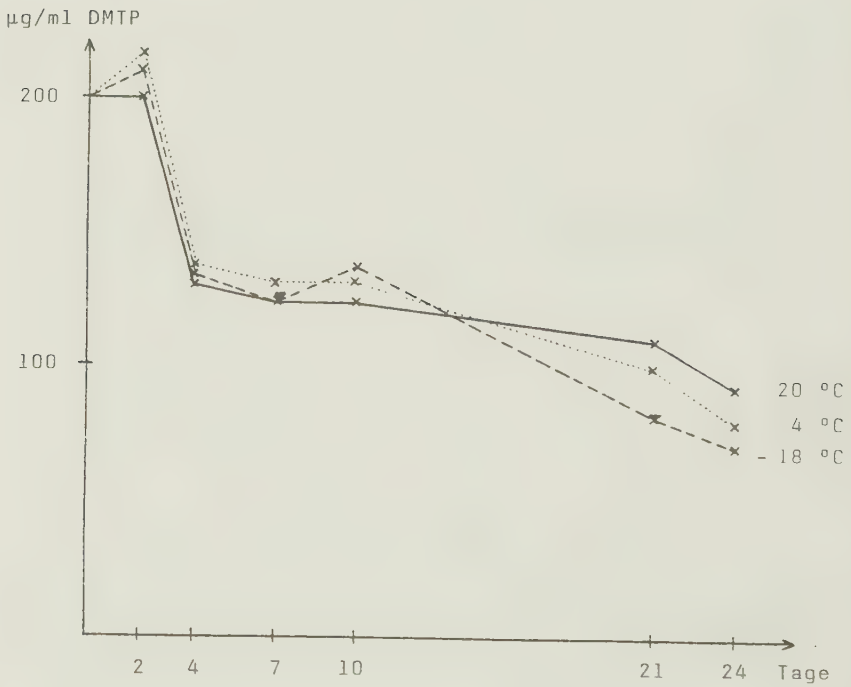


Abbildung 29:

Verlauf der DMTP-Konzentration im Lagerversuch "Harn 1"



7.3.2. Lagerversuch "Harn 2"

Die im Verlauf des 21-tägigen Lagerversuches gemessenen DMP- und DMTP-Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 18) aufgelistet:

Tabelle 18: Ergebnisse des 21-tägigen Lagerversuches mit "Harn 2"
(alle Meßwerte sind Konzentrationsangaben in µg/ml)

Tag:	0	11	17	21	
	Start			Ende	
20 °C					
DMP	50	22,5	46,7	33,8	68 %
DMTP	10	6,6	4,2	3,7	37 %
4 °C					
DMP	50	29,2	26,4	22,2	44 %
DMTP	10	5,9	5,6	3,0	30 %
-18 °C					
DMP	50	20,8	31,9	23,6	47 %
DMTP	10	8,0	6,7	3,0	30 %

Die letzte Spalte in Tabelle 18 gibt die bei Versuchsende noch gefundene Konzentration in % des Ausgangswertes an.

Durchschnittswerte:

DMP nach 21 Tagen 53 %

DMTP nach 21 Tagen 32 %

In den folgenden Abbildungen (Abb. 30 und 31) sind die gemessenen DMP- bzw. DMTP-Konzentrationen im Verlauf dieses Lagerversuches über 21 Tage graphisch dargestellt:

Abbildung 30:

Verlauf der DMP-Konzentration im Lagerversuch "Harn 2"

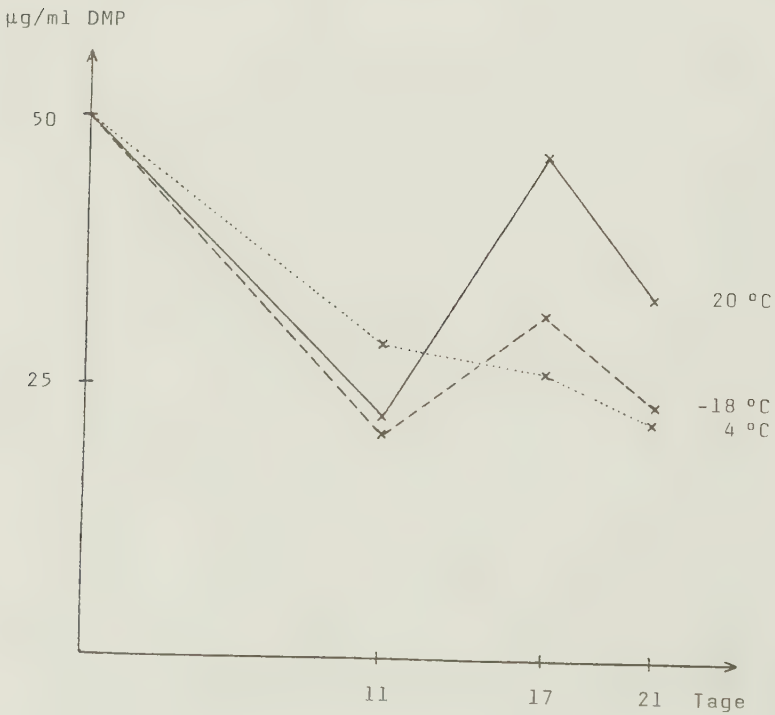
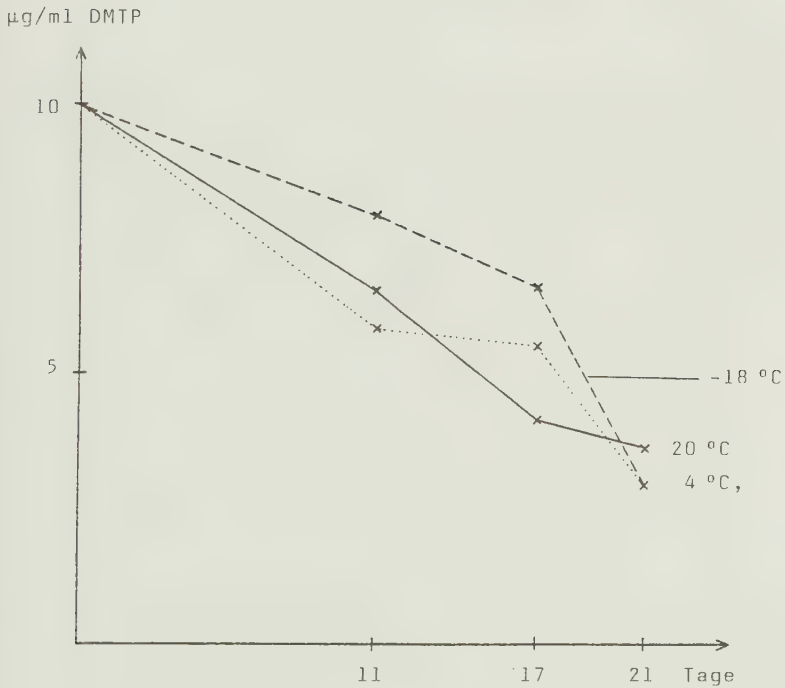


Abbildung 31:

Verlauf der DMTP-Konzentration im Lagerversuch "Harn 2"



7.4. Ergebnis

Bei beiden Versuchsreihen wurde ein deutlicher Abfall der DMP- und DMTP-Konzentrationen über 3 bzw. 3 1/2 Wochen gefunden. Dabei wurden am Versuchsende bei DMP noch größenordnungsmäßig 50 - 60 %, bei DMTP noch ca. 30 - 40 % des Ausgangswertes gefunden. Die Ergebnisse von Comer et al. (1976) konnten also im großen und ganzen bestätigt werden. Genauere Aussagen sind wegen der relativ geringen Präzision der Messungen leider nicht möglich, die Tendenz ist jedoch eindeutig erkennbar.

Bezüglich der Lagertemperatur wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, im Kühlschrank oder in der Tiefkühltruhe gefunden, was ebenfalls mit den Ergebnissen von Comer et al. (1976) übereinstimmt. Daraus ergibt sich folgende Konsequenz:

- (1) Bezüglich der Lagertemperatur und auch beim Transport der Proben sind keine besonderen Vorschriften zu beachten. Zweckmäßigerweise wird man biologische Untersuchungsmaterialien wegen der sonst verstärkten Fäulnisprozesse kühl aufbewahren. Für den Nachweis der Dialkyl-(thio)phosphate ist dies nicht unbedingt erforderlich.
- (2) Die Forderung, Proben nach Abnahme möglichst bald zu analysieren, bleibt bestehen. Dies gilt insbesondere für (halb)quantitative Analysen. Bei qualitativen Untersuchungen ist nach unseren Erfahrungen, wenn ausreichend hohe Ausgangswerte vorlagen, ein Nachweis auch nach längeren Zeiträumen, eventuell sogar mehreren Monaten, noch möglich.

E ANWENDUNG DER METHODE ZUM GASCHROMATOGRAPHISCHEN
NACHWEIS UND DER TRENNUUNG VON DMP UND DMTP AN
KLINISCHEN FALLBEISPIELEN

1. Anwendungsbeispiel:
Suizidversuch mit Methyl-Parathion

1.1. Anamnese

Der Patient, 64 Jahre,
unternahm am 27.2.1981 einen Selbstmordversuch mit
einem Pflanzenschutzmittel auf Alkylphosphatbasis.
Der Patient wurde von seiner Ehefrau in den frühen
Nachmittagsstunden des 27.2.1981 in der Wohnung liegend
in bewußtlosem Zustand aufgefunden. Aufgrund der fremd-
anamnese von der Ehefrau mußte mit der Möglichkeit
einer E 605-Vergiftung gerechnet werden. Es wurde
eine Weichspüler-Flasche gefunden mit der Aufschrift
"E 605", die darin enthaltene Flüssigkeit war aller-
dings gelb, nicht blau (blauer Warnfarbstoff bei
E 605).

Die Erstversorgung des Patienten erfolgte nach not-
fallmäßiger Aufnahme in die Intensivstation der
Inneren Abteilung eines Kreiskrankenhauses. Der Patient
zeigte erhebliche respiratorische Insuffizienz, Bewußt-
seinsverlust, livide Farbe, vermehrten Speichelfluß,
maximal enggestellte Pupillen, sowie Kaltschweißigkeit
bei stabilen Blutdruckverhältnissen. Der Blutdruck
betrug 140/80 mm Hg, Pulsfrequenz 45 - 50/min brady-
card. Die oberen Extremitäten waren gestreckt und
nach außen rotiert, die Finger beider Hände beidseits
in mäßiger Beugekontraktur verkrampft. Die Serum-
Cholinesterase-Aktivität war < 195 mU (nicht meßbar).

EKG nach Atropingabe: Frequenz 140/min, Überdreher Linkstyp, deutliche Störung der Repolarisation bei links-anterioem Hemiblock.

Die Erstversorgung umfaßte folgende Maßnahmen: Magenspülung mit ca. 10 l Spülflüssigkeit (Farbe hellgelb, keine Tablettenreste, süßlich bitterer Geruch). Zentraler Venenkatheter linksseitig, weitere venöse Zugänge über 2 Braunülen bei ausgeprägter Obstruktion, i.v.-Injektion von 0,24 mg Enphyllin, 1 g Solodecortin. Anfängliche Beatmung mit dem Ambubeutel bei Intubation, ca. 1/2 Std. später ausreichende Spontanatmung. Beginn einer forcierten Diurese mit Kaliumsubstitution. Wegen metabolischer Azidose Gabe von ca. 300 ml Natriumbicarbonat 8,4 %ig. Als Antidot Gabe von 4 mg Atropin i.v.

Der Patient wurde nach Abschluß dieser Maßnahmen gegen ca. 16.15 Uhr des gleichen Tages per Rettungshubschrauber in eine Spezialabteilung zur Behandlung von Vergiftungen überführt.

1.2. Verlauf

Bei der Aufnahme am 27.2.81 war der Patient bereits notversorgt (Magenspülung, Intubation, Antidotgabe). Der Patient wurde sofort erneut magengespült und erhielt zunächst 1,1 g Atropin. Der Patient konnte daraufhin mit einer Dauerinfusion von ca. 500 mg/Std. Atropin zunächst stabilisiert werden. Die Serumcholinesterase war wie erwartet stark erniedrigt, zeigte aber im Verlauf leichte Tendenzen zur Erhöhung.

Der stationäre Verlauf war kompliziert durch das Auftreten von Krämpfen. Im EEG konnten, wie zu erwarten, spikes-waves beobachtet werden, die unter Hirnödem-Prophylaxe verschwanden. Im EEG fand sich zuletzt ein pathologisches Hirnstrombild mit fast durchgehendem sogenanntem Burst-Suppression-Muster. Nach neurologischer Beurteilung deutet dies auf eine sehr ungünstige Prognose hin.

Der Patient war immer bewußtlos, sein Zustand besserte sich nicht. Zuletzt ließ sich trotz hohen Gaben von Atropin, Dopamin, Dobutrex, Novadra, Alupent bzw. Suprarenin kein stabiler Kreislauf herstellen.

Trotz intensiver Behandlung verstarb der Patient am 4.3.1981 an der Alkylphosphat-Intoxikation unter dem Bilde des Herz- und Kreislaufversagens.

1.3. Vorliegende laborchemische und toxikologische Befunde

Im folgenden sind die uns bekannten laborchemischen und toxikologischen Befunde zu diesem klinischen Fallbeispiel aufgeführt. Sie interessieren vor allem im Vergleich zu den Ergebnissen unserer gaschromatographischen Analysen auf Dimethylphosphat (DMP) und Dimethylthiophosphat (DMTP).

1.3.1. Verlauf der Serum-Cholinesterase-Aktivität

Die folgende Tabelle (Tab. 19) zeigt den Verlauf der Serum-Cholinesterase-Aktivität während dem 6-tägigen Intensivpflegeaufenthalt des Patienten vom 27.2.1981 bis 4.3.1981.

Der Normbereich der Serum-Cholinesterase-Aktivität wird mit 3000 - 9300 U/l angegeben.

Tabelle 19: Verlauf der Serum-Cholinesterase-Aktivität während der Intensivpflege vom 27.2.81 bis 4.3.81

Datum	Zeit	Cholinesterase-Aktivität U/l
28.2.	13.00	336,2
1.3.	6.00	379,2
2.3.	6.00	480,9
3.3.	6.00	531,7

1.3.2. p-Nitrophenol-Bestimmung im Urin

Die quantitative Bestimmung von p-Nitrophenol im Urin wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt. Sie erfolgte nach Eben und Geldmacher - v. Mallinckrodt (1978):

Folgende Werte wurden bei der Analyse der Harnproben gefunden (Tab. 20):

Tabelle 20: Ergebnisse der p-Nitrophenol-Bestimmung im Urin

Datum	Entnahmezeit	p-Nitrophenolgehalt mg/l	
27.2.81	18.00	6,0	
27.2.81	19.00	8,2	
28.2.81	8.30	}	ø unterhalb Nachweisgrenze
1.3.81	6.00		
2.3.81	6.00		
3.3.81	6.00		
4.3.81	6.00		

1.4. Gaschromatographische Prüfung auf DMP und DMTP in Serum

1.4.1. Auswahl der Probe

Folgende Probe stand für unsere Analyse zur Verfügung:

Serum ("G-Blut") vom 27.2.1981 19.00 Uhr

Die Messung erfolgte am 6.3.1981, also 8 Tage nach Abnahme der Probe. Die Probe wurde bis zu diesem Zeitpunkt bei -18 °C gelagert. Nach den Ergebnissen unserer Lagerversuche war anzunehmen, daß bis zum Zeitpunkt der Messung sowohl bei dem Dimethyl(thio)-phosphat als auch bei dem unzersetzten Pflanzenschutzmittel noch keine meßbare Zersetzung eingetreten war.

1.4.2. Aufarbeitung der Probe

Die für die Untersuchung zur Verfügung stehende Probe wurde, wie auf S.131 ff beschrieben, vorbereitet, extrahiert und für die gaschromatographische Trennung derivatisiert. Die Probe wurde sowohl verseift wie unverseift aufgearbeitet. Die Verseifungsbedingungen wurden mit 90 °C für 90 min gewählt. Die Serumprobe wurde zudem wegen der besseren Verarbeitbarkeit 1:1 (V/V) mit H₂O bidest. verdünnt. Die Extraktion erfolgte, wie beschrieben, durch 5maliges Ausschütteln mit dem doppelten Volumen Diethylether, die Einengung der Extrakte am Rotationsverdampfer und unter N₂-Strom. Die Extrakte wurden methyliert und ethyliert, da aufgrund der unklaren Anamnese und der nicht eindeutigen Laborbefunde eine Dimethyl(thio)phosphatvergiftung nicht gesichert war und anorganisches Phosphat wegen Verwechslungsgefahr mit Dialkylphosphaten eliminiert werden mußte.

1.4.3. Gaschromatographische Messung und Auswertung

Die gaschromatographische Messung der methylierten Extrakte erfolgte unter den auf S. 136 angegebenen Bedingungen, die Einspritzmenge betrug jeweils 1 µl, als Meßbereich wurde Range 10^3 /Attenuation 4 gewählt.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 32 bis 35) zeigen die aufgezeichneten Schreiberkurven als direkte Ergebnisse der gaschromatographischen Messung. Die angegebenen Retentionszeiten wurden dabei von Hand mitgestoppt. Die Ergebnisse bei der Auswertung dieser Kurven sind in der sich anschließenden Tabelle (Tab. 21) aufgelistet.

Abbildung 32:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Serum vom 27.2.1981 19.00 Uhr (unverseift)

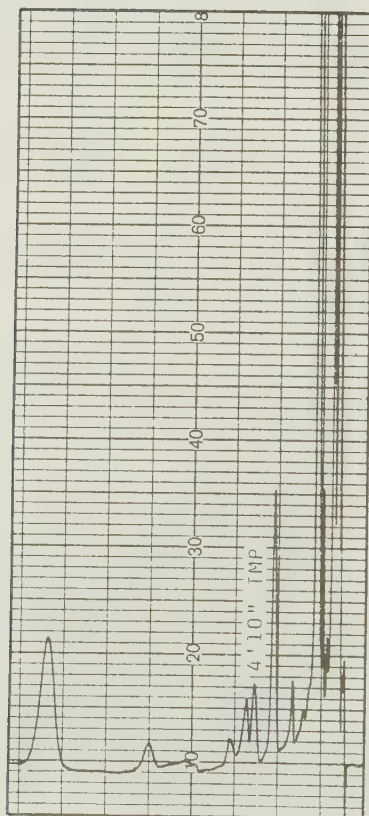


Abbildung 33:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Serum vom 27.2.1981 19.00 Uhr (unverseift)

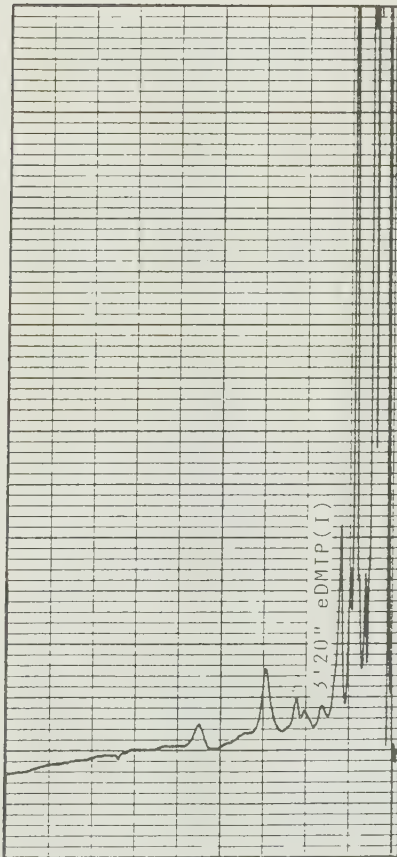


Abbildung 34:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Serum vom 27.2.1981 19.00 Uhr (verseift)

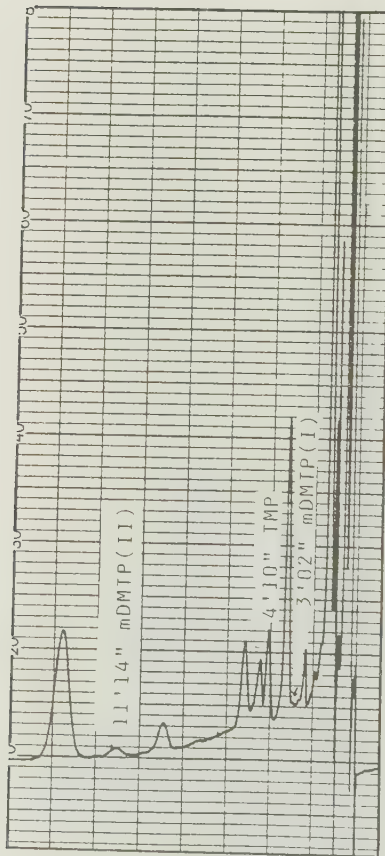
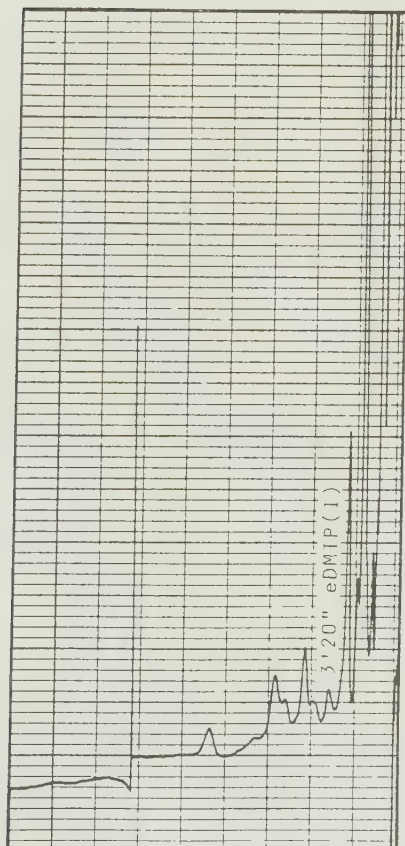


Abbildung 35:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Serum vom 27.2.1981 19.00 Uhr (verseift)



In Tabelle 21 sind die ausgemessenen Peakflächen, die berechneten Substanzmengen in 1 µl alkyliertem Extrakt (bezogen auf im Extrakt vorliegendes DMP und DMTP, nicht auf die Alkylierungsprodukte) und die berechneten Konzentrationen, bezogen auf das untersuchte Asservat, zusammengestellt.

Die Berechnung der Substanzmengen in 1 µl alkyliertem Extrakt erfolgte aufgrund der erhaltenen Peakflächen über die S. 50 ff, S. 63 ff, S. 72 ff und S. 79 ff angegebenen Eichkurven für methyliertes bzw. ethyliertes DMP und DMTP mittels eines Korrekturfaktors, der die unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten ausglich.

Bei der Berechnung der Konzentrationen, bezogen auf die zu untersuchende Probe, wurde eine Extraktionsausbeute von 6 % für DMP und 100 % für DMTP zugrunde gelegt und der jeweilige Verdünnungsfaktor bei der Aufarbeitung der Probe berücksichtigt.

Tabelle 21: Auswertung der gaschromatographischen Messungen

DMP			DMTP		
Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)	Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)
Serum 27.2.81, 19.00 h unverseift	-	-	-	-	-
Serum 27.2.81, 19.00 h verseift	-	-	9,0	0,3	0,3

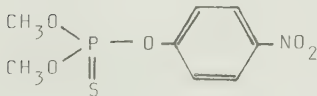
1.5. Ergebnis

In der aufgearbeiteten Probe wurde bei direkter Aufarbeitung in Spuren (0,3 mg/l) DMTP gefunden, jedoch kein DEP und DETP, wie dies bei Parathion-Vergiftung zu erwarten wäre. Gegen eine E 605-Intoxikation des Patienten spricht auch, daß sowohl in der Weichspülmittelflasche mit der Aufschrift E 605, die in der Wohnung des Patienten gefunden wurde, sich gelbe Flüssigkeit befand als auch, daß die Magenspülflüssigkeit der ersten Magenspülung des Patienten gelb gefärbt war. Bei Parathion-Äthyl-Intoxikation hätte der blaue Warnfarbstoff des Parathion-Äthyl gefunden werden müssen. Der Verdacht auf eine Parathion-Äthyl-Intoxikation konnte somit nicht bestätigt werden.

Die Identifikation des gesuchten Pflanzenschutzmittels wird durch die Tatsache erleichtert, daß bei den Laboruntersuchungen im Harn des Patienten vom 27.2.81, 18.00 und 19.00 Uhr p-Nitrophenol in hohen Konzentrationen gefunden wurde. Die Kombination der Metaboliten Dimethylthiophosphat und p-Nitrophenol spricht für die Diagnose "Alkylphosphatintoxikation" und läßt auf Methyl-Parathion schließen, das folgende Strukturformel besitzt:

Parathion-Methyl

O,O-Dimethyl-O-(4-nitro-phenyl)-monothiophosphat



2. Anwendungsbeispiel:
 Intoxikation mit Metasystox

2.1. Anamnese und Verlauf

Der Patient, 42 Jahre alt, nahm am 13.10.1980 in suizidaler Absicht ein Pflanzenschutzmittel auf Alkylphosphatbasis ein. Er wurde von seiner Ehefrau um ca. 17.00 Uhr dieses Tages aufgefunden. Aufgrund der Fremdanamnese der Ehefrau erschien eine Vergiftung mit Metasystox^R als wahrscheinlich.

Als Erstversorgung während des Hubschraubertransports von seinem Wohnort in eine Spezialklinik erhielt der Patient 1 g Cortison und 100 mg Atropin i.v.

Er zeigte bei der Einlieferung in die Klinik eine leichte Atemdepression (Atmung oberflächlich, Frequenz 10 - 12 min⁻¹) Unruhe, Bewußtseinsstörungen, generalisierte starke Krampfbereitschaft, kalte Haut, im Gesicht marmorisiert, eine ausgeprägte Zyanose und deutlichen Geruch nach Alkylphosphaten.

Der Blutdruck betrug 170/110 mm Hg, die Pulsfrequenz 168 min⁻¹, unregelmäßig. Der Patient hatte erbrochen, der Mageninhalt war massiv blau (Warnfarbstoff) bei starkem Geruch nach Alkylphosphaten. Die Versorgung hier umfaßte Intubation mit Beatmung, einen zentralen Zugang links, Magenspülung mit Kohle-Na₂SO₄, 250 ml NaHCO₃ und als Antidot 250 mg Toxogonin i.v.

Im biologischen Test auf Insektizid (*Drosophila melanogaster*) mit Mageninhalt vom 13.10.1980 waren nach 75 min alle Tiere verendet.

Anfänglich war die Serum-Cholinesterase-Aktivität auf Werte um 230 mU abgesunken, im weiteren Verlauf jedoch normalisiert sich dieser Wert.

Während des ganzen stationären Aufenthalts fanden sich leicht erhöhte Transaminasen, erhöhte alkalische Phosphatase und γ -GT. Zur Abklärung eines vorhandenen Leberparenchymschadens wurde ein Oberbauchsonogramm, eine i.v. Cholecystangiographie und eine Laparoskopie durchgeführt, eine Gastroskopie ergab ein nicht mehr ganz frisches Ulcus duodeni. Ein vorhandener Diabetes mellitus wurde mit 12 BE Diabetes-Diät eingestellt. Der Patient mußte 14 Tage beatmet werden, deshalb erfolgte eine Tracheotomie.

Im weiteren Verlauf traten komplizierend eine Pneumonie und eine Tracheomalazie im Bereich des Tracheostomas hinzu. Insgesamt erhielt der Patient 8 g Atropin als spezielles Antidot. Er wurde am 11.11.80 zur psychiatrischen Behandlung verlegt.

Die Probe (Blut vom 13.10.1980, 18.55 Uhr) wurde zur Untersuchung auf Metasystox an das Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen - Nürnberg übersandt.

2.2. Gaschromatographische Untersuchung auf DMP und DMTP in Vollblut

2.2.1. Aufarbeitung der Probe

Folgende Probe stand für unsere Analysen zur Verfügung:

Vollblut vom 13.10.1980 18.55 Uhr

Leider konnte die Messung erst am 23.3.1981, also erst 5 Monate nach Abnahme der Probe erfolgen. Die Probe wurde bis zu diesem Zeitpunkt tiefgekühlt bei -18°C gelagert. Nach den Ergebnissen unserer Lagerversuche war jedoch anzunehmen, daß ein großer Teil der ursprünglich vorhandenen

Dimethyl(thio)phosphate bereits zerstört war. Zudem bestand die Möglichkeit, daß als Zerfallsprodukte des Metasystox während der Lagerung DMP und DMTP gefunden würde, das ursprünglich nicht enthalten war.

Eine quantitative Auswertung erschien unter diesen Umständen nicht sinnvoll. Ein halbquantitativer Vergleich der gemessenen Werte erschien jedoch sehr interessant und wurde trotz der möglichen Vorbehalte durchgeführt.

Die für die Untersuchung zur Verfügung stehende Probe wurde wie auf S. 131 ff beschrieben vorbereitet, extrahiert und für die gaschromatographische Trennung derivatisiert, sie wurde sowohl verseift wie unverseift aufgearbeitet. Die Verseifungsbedingungen wurden mit 90 °C für 90 min gewählt. Die Extraktion erfolgte, wie beschrieben, durch 5maliges Ausschütteln mit dem doppelten Volumen Diethylether, die Einengung der Extrakte am Rotationsverdampfer und unter N_2 -Strom.

Alle Extrakte wurden methyliert und ethyliert, da aufgrund fehlender Anamnese und anderer Laborbefunde eine Dimethyl(thio)phosphatvergiftung nicht gesichert war. Die Extrakte wurden in ethylierter Form gemessen, um bei Anwesenheit von Dimethylphosphat die Gefahr der Verwechslung mit anorganischem Phosphat auszuschließen. Zur Absicherung wurden die Extrakte trotzdem auch in methylierter Form gemessen. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse, wobei im methylierten Ansatz sowohl DMP als auch anorganisches Phosphat das gleiche Reaktionsprodukt TMP ergeben.

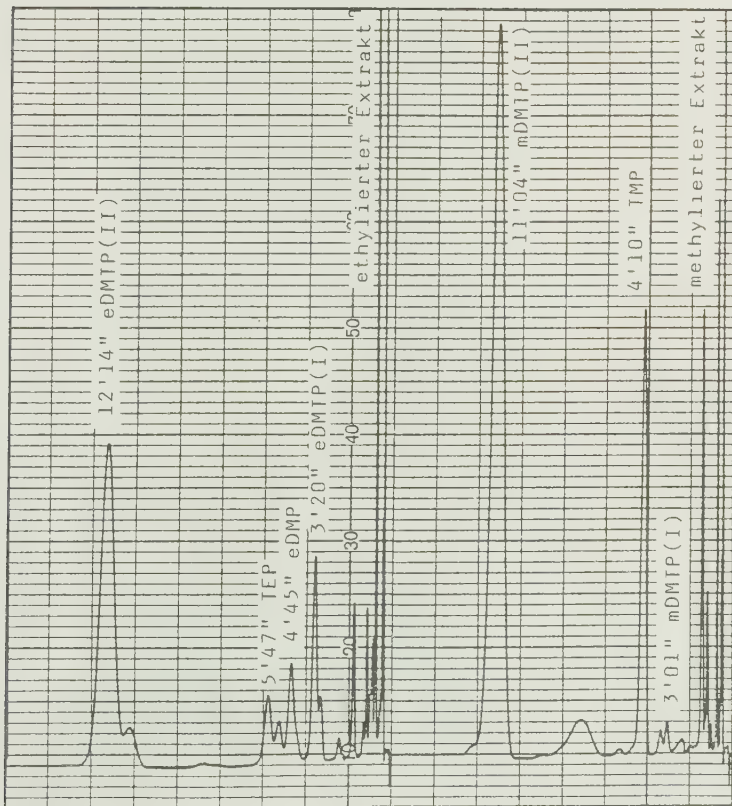
In Abbildung 36 ist ein derartiger Vergleich der Messung von methyliertem und ethyliertem Extrakt dargestellt. DMP und anorganisches Phosphat können nur im ethylierten Extrakt getrennt werden, im methylierten überlagern sie sich (s. Abb. 36).

Abbildung 36:

Beispiel für den Vergleich von methyliertem und ethyliertem Extrakt bei der gaschromatographischen Messung

Probe: Vollblut vom 13.10.80, 18.55 Uhr (verseift)

	Peakflächen (mm ²)		
	TMP	DMP	DMTP
methyliert	158	212	704
ethyliert	-	56	404



2.2.2. Gaschromatographische Messung und Auswertung

Die gaschromatographische Messung der alkylierten Extrakte erfolgte unter den auf S.136 angegebenen Bedingungen, die Einspritzmenge betrug jeweils 1 μ l.

Die unverseiften Extrakte wurden im Meßbereich Range 10^3 /Attenuation 4, die verseiften Extrakte im Meßbereich Range 10^4 /Attenuation 4 gemessen.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 37 bis Abb. 40) zeigen die aufgezeichneten Schreiberkurven als direkte Ergebnisse der gaschromatographischen Messung. Die angegebenen Retentionszeiten wurden dabei von Hand mitgestoppt. Die Ergebnisse bei der Auswertung dieser Kurven sind in der sich anschließenden Tabelle (Tab. 22) aufgelistet.

Abbildung 37:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Vollblut vom 13.10.80 18.55 Uhr (unverseift)

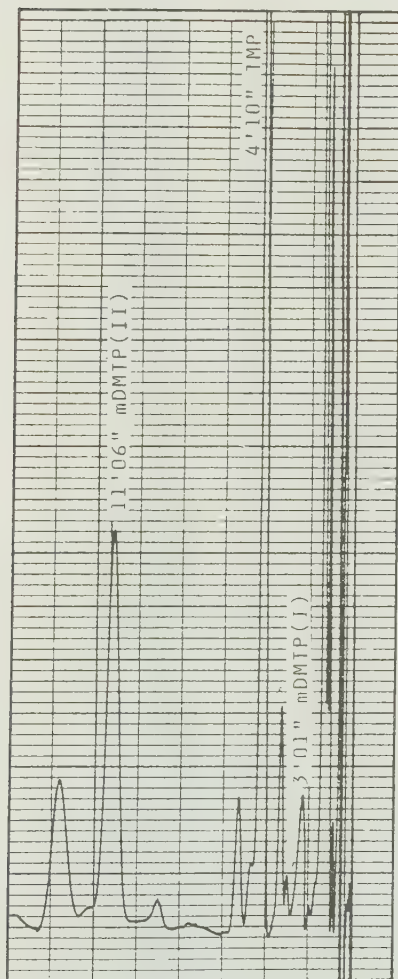


Abbildung 38:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Vollblut vom 13.10.80 18.55 Uhr (unverseift)

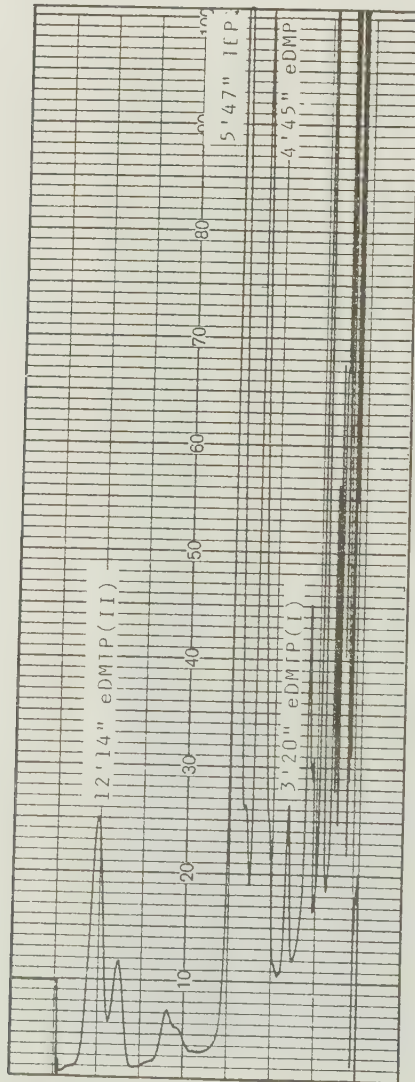


Abbildung 39:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extrakte
von

Vollblut vom 13.10.80 18.55 Uhr (verseift)

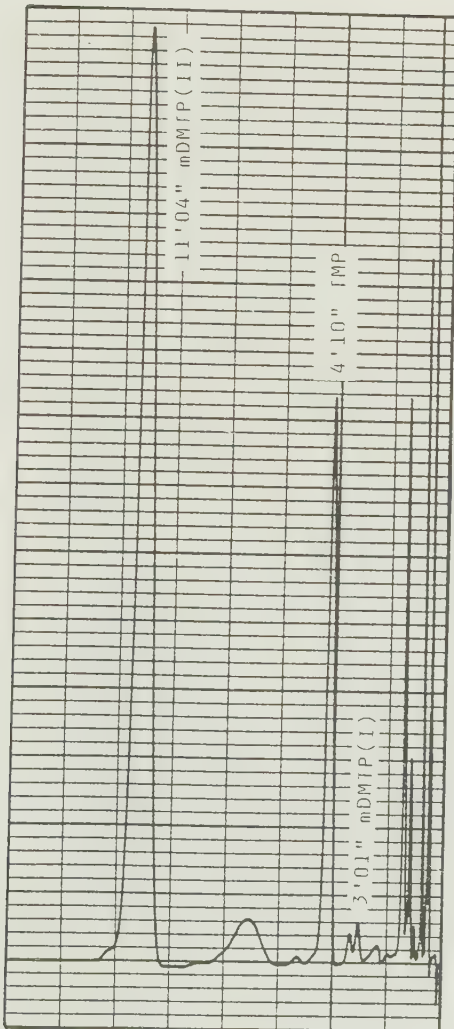
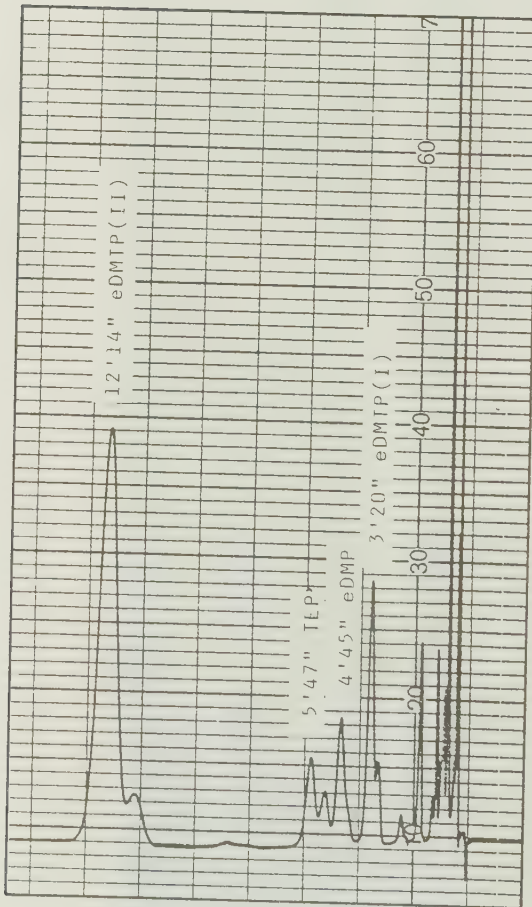


Abbildung 40:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Vollblut vom 13.10.80 18.55 Uhr (verseift)



In Tabelle 22 sind die ausgemessenen Peakflächen, die berechneten Substanzmengen in 1 µl ethyliertem Extrakt (bezogen auf im Extrakt vorliegendes DMP und DMTP, nicht auf die Ethylierungsprodukte) und die berechneten Konzentrationen, bezogen auf das untersuchte Asservat, zusammengestellt.

Die Berechnung der Substanzmengen in 1 µl ethyliertem Extrakt erfolgte aufgrund der erhaltenen Peakflächen über die auf S. 63 ff und S. 79 ff angegebenen Eichkurven für ethyliertes DMP und DMTP mittels eines Korrekturfaktors, der die unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten ausglich.

Bei der Berechnung der Konzentrationen, bezogen auf die zu untersuchenden Proben, wurde eine Extraktionsausbeute von 6 % für DMP und 100 % für DMTP zugrunde gelegt und der jeweilige Verdünnungsfaktor bei der Aufarbeitung der Proben berücksichtigt.

Tabelle 22: Auswertung der gaschromatographischen Messungen

	DMP			DMTP		
	Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)	Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)
Blut 13.10.80 18.55 Uhr unverseift	678	39,2	11,8	235,5	1,8	0,54
Blut 13.10.80 18.55 Uhr verseift	46	19,7	5,91	376,0	22,0	6,6

2.3. Ergebnis

In allen aufgearbeiteten Proben wurde eindeutig DMP und DMTP in Konzentrationen weit oberhalb der Nachweisgrenze gefunden. Qualitativ entspricht dies dem bei einer Metasystox-Vergiftung erwarteten Ergebnis. Ein Rückschluß auf die ursprünglichen Werte ist, wie bereits erwähnt, nach 5-monatiger Lagerung nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, daß beim langsamen Zerfall des Metasystox und seiner Stoffwechselprodukte immer wieder neues DMP und DMTP entstehen kann. Der DMTP-Spiegel zeigt nach Verseifung einen signifikant höheren Wert als vorher. Demnach müßte, wie zu erwarten war, im Blut auch Metasystox enthalten sein, das nach Hydrolyse als DMTP erscheint. Außerdem findet sich regelmäßig TEP als

Ethylierungsprodukt des in Spuren mitextrahierten organischen Phosphates.

Die entwickelte gaschromatographische Methode erwies sich in diesem klinischen Fallbeispiel als praktisch anwendbar. Die qualitativen Ergebnisse für DMP und DMIP waren eindeutig und konnten die Diagnose "Alkylphosphat-Intoxikation" sichern.

3. Anwendungsbeispiel:
 Intoxikation mit Metasystox

3.1. Anamnese und Verlauf

Der Patient, 59 Jahre alt, im Zustand nach Oberschenkelamputation links, unternahm am 30.12.1980 gegen 10.00 Uhr einen Selbstmordversuch mit einem Pflanzenschutzmittel auf Alkylphosphatbasis und brachte sich zusätzlich eine Wunde an der linken Halsseite bei. Er wurde sofort nach Einnahme des Giftes (250 ml Metasystox) von seiner Ehefrau gefunden. Bei Eintreffen des Notarztes war der Patient noch ansprechbar, kurze Zeit später war eine Reanimation mit Intubation erforderlich. Bei Notfallaufnahme in ein Krankenhaus um 10.30 Uhr zeigte der Patient trotz 400 mg Dopamin- und 180 mg Atropin-Gabe völlig darniederliegende Kreislaufverhältnisse. Es wurde eine Magenspülung durchgeführt (ca. 20 l), der Patient wurde zusätzlich mit 4 Amp. Alupent, 7 Amp. Aktrinor, 1 Amp. Lasix, 500 mg Toxogonin, 500 ml NaHCO_3 und 500 ml Macrodex 6 % behandelt. Während des Hubschraubertransports in eine Spezialklinik zur Behandlung von Vergiftungen bekam der Patient nochmals 200 mg Atropin sowie eine Blutkonserve und 250 ml NaHCO_3 .

Bei Aufnahme war der Patient bewußtlos, zeigte keine Reflexe, jedoch eine idiomuskuläre Wulstbildung, die Augen zeigten Mydriasis und Isocorie. Die Haut war peripher kalt, zentral etwas wärmer bei einer Rektaltemperatur von $31,6^\circ\text{C}$. Die Pulsfrequenz betrug 68 min^{-1} , unregelmäßig, bei einem Blutdruck von $40/-\text{ mm Hg}$ und einem Blutzuckerwert von 200 mg dl^{-1} . Das EKG zeigte bei Indifferenztyp ein Vorhofflimmern mit absoluter Arrhythmie. Bei der sofort durchgeführten Magenspülung

zeigte sich noch reichlich blaugefärbte Giftlösung (Warnfarbstoff), die Serum-Cholinesterase-Aktivität war um 14.30 Uhr auf 100 mU abgesunken (Normbereich 3500 - 8000 mU).

Der Zustand um 19.00 Uhr am 30.12.1980 war deutlich verschlechtert, der Patient hatte bei schlechter Gerinnung (Quick 19 %, PTT 101 sek, Fibrinogen $< 75 \text{ mg dl}^{-1}$, Thrombinzeit $> 50 \text{ sek}$) generalisierte Blutungen, die Rektaltemperatur war $30,7^\circ\text{C}$, der Blutdruck nicht meßbar, das EEG zeigte eine Nulllinie.

Trotz intensiver Behandlung blieb der Patient im protrahierten Schock, es entwickelte sich ein Leber- und Nierenversagen, der Patient mußte ständig Blutkonserven erhalten. Er verstarb am 31.12.1980 um 03.35 Uhr im Herz- und Kreislaufversagen.

Die uns zur Verfügung stehenden Proben wurden zur Untersuchung auf Metasystox an das Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen - Nürnberg übersandt.

3.2. Gaschromatographische Untersuchung der Proben auf DMP und DMIP

3.2.1. Auswahl der Proben

Folgende Proben standen für unsere Analysen zur Verfügung:

Magenentleerung	vom 30.12.80	14.30 Uhr
Magenspüllösung I	vom 30.12.80	14.50 Uhr
Urin	vom 30.12.80	14.30 Uhr
Blut	vom 30.12.80	14.30 Uhr

Die Messung erfolgte am 23.3.1981, also fast 3 Monate nach Abnahme der Proben. Alle Proben wurden bis zu diesem Zeitpunkt tiefgekühlt bei -18°C gelagert. Nach den Ergebnissen unserer Lagerversuche mußte auch in diesem Fall angenommen werden, daß ein großer Teil der ursprünglich vorhandenen Dimethyl(thio)-phosphorsäure bereits zerstört war, während das vorhandene Metasystox nach Schrader (1963) in neutraler und saurer Lösung gegen hydrolytische Einflüsse recht beständig ist.

Andererseits bestand die Möglichkeit, daß als Zerfallsprodukte des Metasystox während der Lagerung DMTP und DMP gefunden würde, das ursprünglich nicht vorhanden war. Eine quantitative Auswertung erschien unter diesen Umständen nicht sinnvoll. Ein halb-quantitativer Vergleich der gemessenen Werte erschien jedoch sehr interessant und wurde trotz der möglichen Vorbehalte durchgeführt.

3.2.2. Aufarbeitung der Proben

Die für die Untersuchung zur Verfügung stehenden Proben wurden wie auf S. 131 ff beschrieben vorbereitet, extrahiert und für die gaschromatographische Trennung derivatisiert. Dabei wurden die Proben der Magenentleerung und Magenspülung vom 30.12.80 nur verseift analysiert, da hier nur das unveränderte Metasystox und keine Metaboliten zu erwarten waren. Alle Harn- und Blutproben wurden sowohl verseift wie unverseift aufgearbeitet. Die Verseifungsbedingungen wurden mit 90°C für 90 min gewählt. Die Extraktion erfolgte, wie beschrieben, durch 5maliges Ausschütteln mit dem doppelten Volumen Diethylether, die Einengung der Extrakte am Rotationsverdampfer und unter N_2 -Strom.

Alle Extrakte wurden methyliert und ethyliert, da aufgrund fehlender Anamnese und anderer Laborbefunde eine Dimethyl(thio)phosphat-Intoxikation nicht gesichert war. Die Extrakte wurden in ethylierter Form gemessen, um bei Anwesenheit von Dimethylphosphat die Gefahr der Verwechslung mit anorganischem Phosphat auszuschließen. Zur Absicherung wurden die Extrakte trotzdem auch in methylierter Form gemessen. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse, wobei im methylierten Ansatz sich DMP und organisches Phosphat überlagern.

3.2.3. Gaschromatographische Messung und Auswertung

Die gaschromatographische Messung der alkylierten Extrakte erfolgte unter den auf S. 136 angegebenen Bedingungen, die Einspritzmenge betrug jeweils 1 µl. Die Extrakte von Magenentleerung und Magenspülung wurden im Meßbereich Range 10^5 /Attenuation 4, die Extrakte von Blut im Meßbereich Range 10^4 /Attenuation 4 und die Extrakte von Urin im Meßbereich Range 10^3 /Attenuation 4 gemessen.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 41 bis Abb. 52) zeigen die aufgezeichneten Schreiberkurven als direkte Ergebnisse der gaschromatographischen Messung. Die angegebenen Retentionszeiten wurden dabei wieder von Hand mitgestoppt. Die Ergebnisse bei der Auswertung dieser Kurven sind in der sich anschließenden Tabelle (Tab. 23) aufgelistet.

Abbildung 41:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Magenentleerung vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)

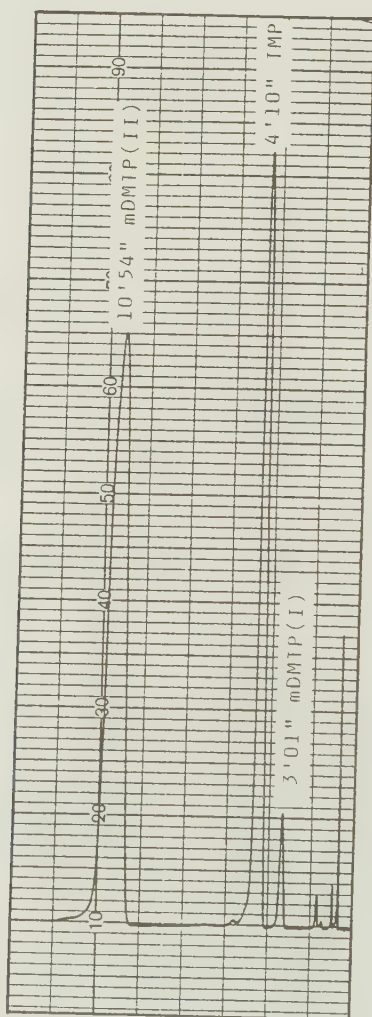


Abbildung 42:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Magenentleerung vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)

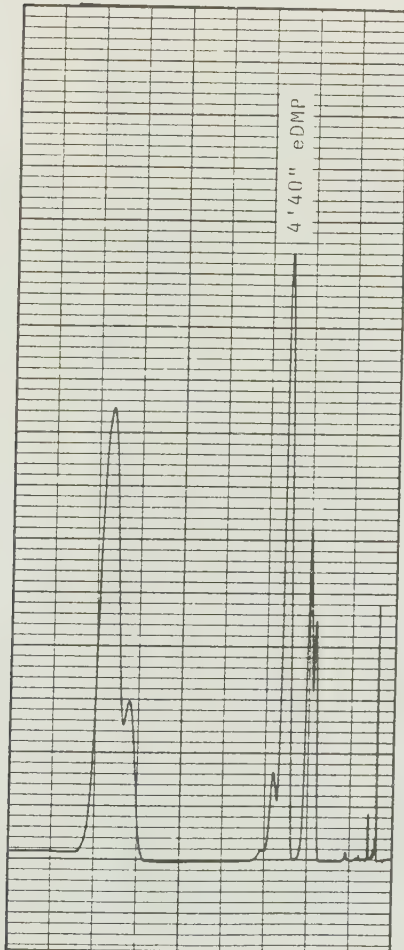


Abbildung 43:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Magenspüllösung I vom 30.12.80 14.50 Uhr (verseift)

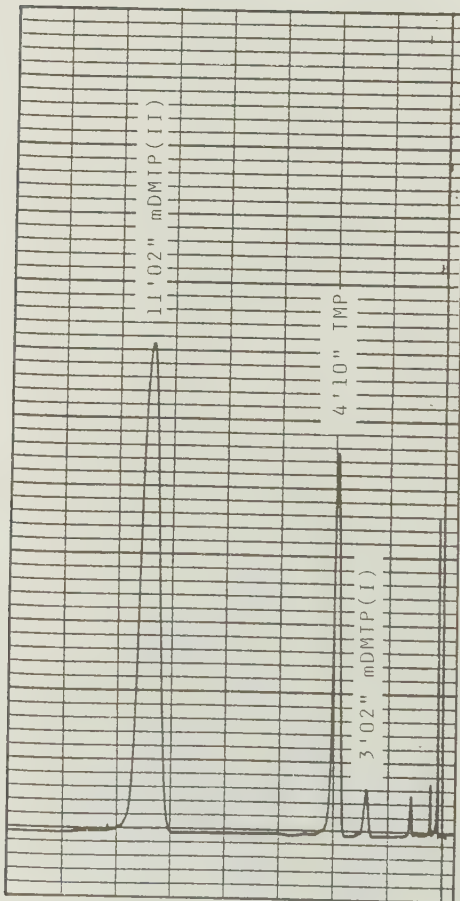


Abbildung 44:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Magenspüllösung I vom 30.12.80 14.50 Uhr (verseift)

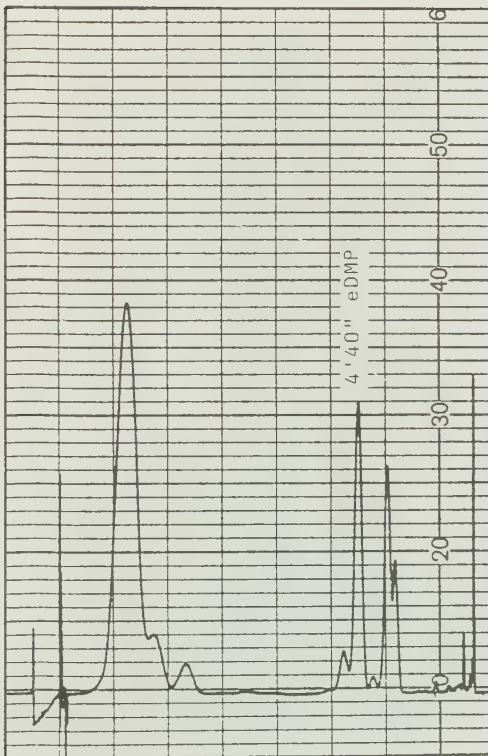


Abbildung 45:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Harn vom 30.12.80 14.30 Uhr (unverseift)

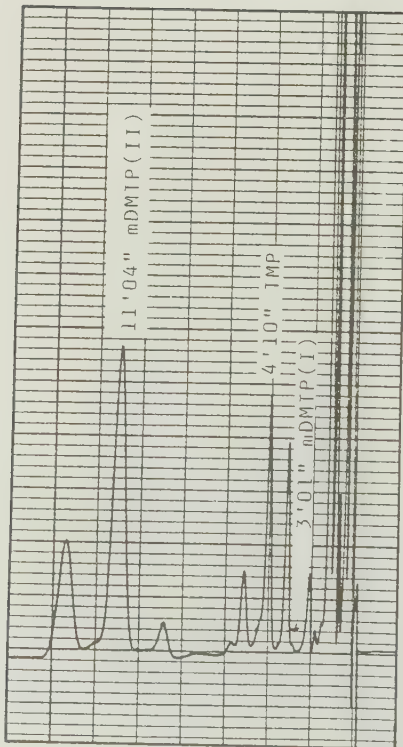


Abbildung 46:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Harn vom 30.12.80 14.30 Uhr (unverseift)

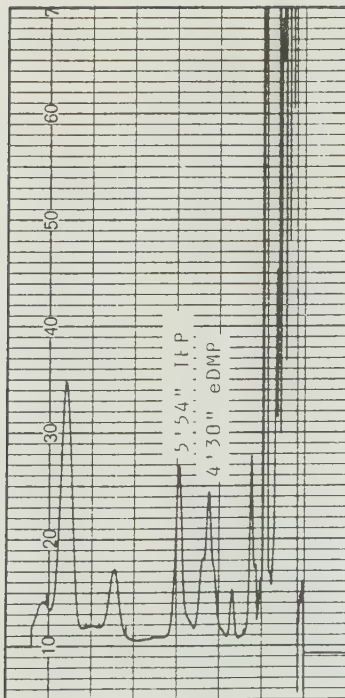


Abbildung 47:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Harn vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)

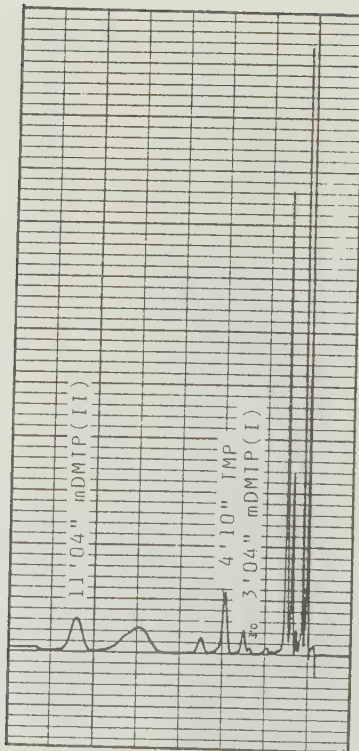


Abbildung 48:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Harn vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)

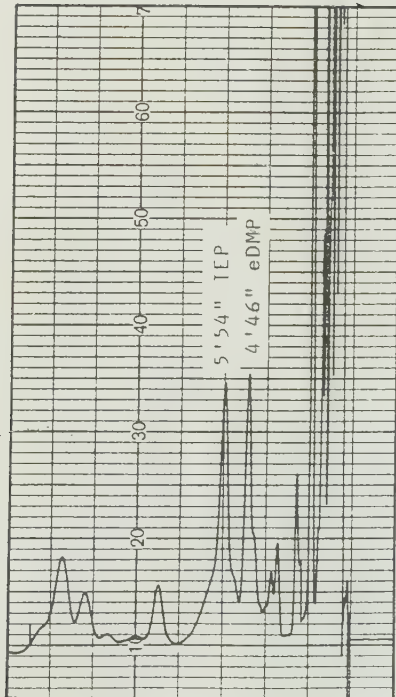


Abbildung 49:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Blut vom 30.12.80 14.30 Uhr (unverseift)

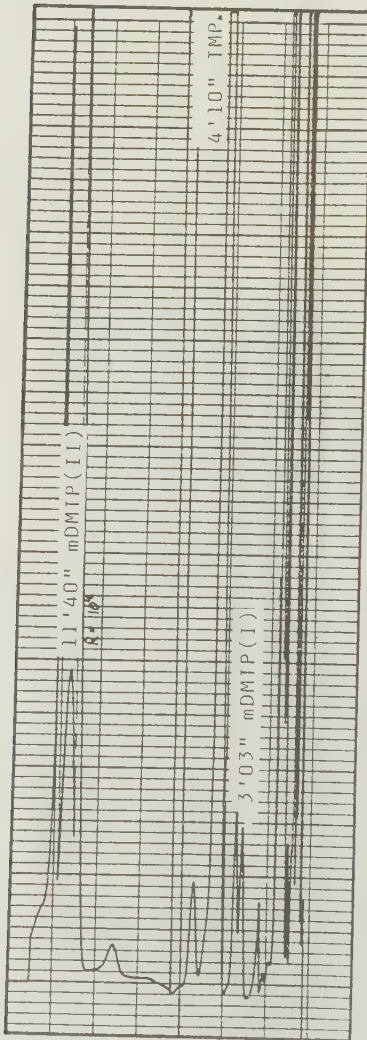


Abbildung 50:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Blut vom 30.12.80 14.30 Uhr (unverseift)

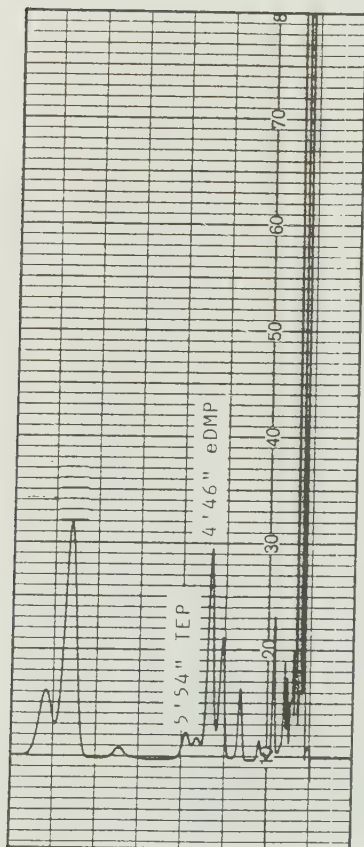


Abbildung 51:

Gaschromatographische Messung des methylierten Extraktes
von

Blut vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)

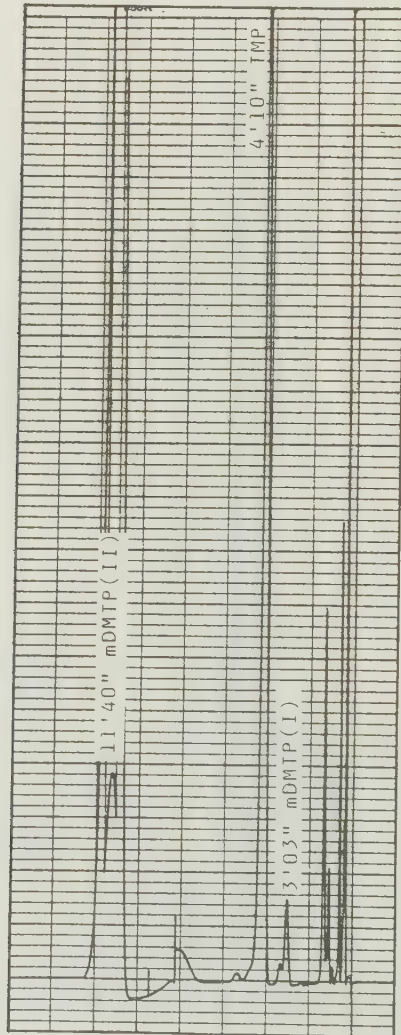
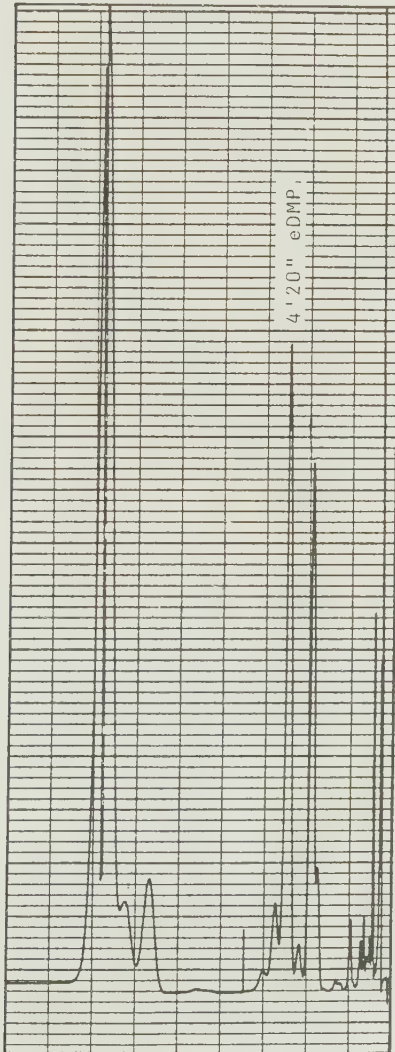


Abbildung 52:

Gaschromatographische Messung des ethylierten Extraktes
von

Blut vom 30.12.80 14.30 Uhr (verseift)



In Tabelle 23 sind die ausgemessenen Peakflächen, die berechneten Substanzmengen in 1 µl alkyliertem Extrakt (bezogen auf im Extrakt vorliegendes DMP und DMTP, nicht auf die Alkylierungsprodukte) und die berechneten Konzentrationen, bezogen auf die untersuchten Asservate, zusammengestellt.

Die Berechnung der Substanzmengen in 1 µl alkyliertem Extrakt erfolgte aufgrund der erhaltenen Peakflächen über die auf S. 63 ff und S. 72 ff angegebenen Eichkurven. Die Auswertung erfolgte für ethyliertes DMP und für methyliertes DMTP, da die Messungen von ethyliertem DMTP für das Isomere DMTP II stark wechselnde Retentionszeiten und wechselnde Störpeaks aufwiesen, die eine halbquantitative Auswertung ausschlossen. Die kombinierte Auswertung von methylierten und ethylierten Extrakten erfolgte anhand der angegebenen Eichkurven und mittels eines Korrekturfaktors, der die unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten ausglich.

Bei der Berechnung der Konzentrationen, bezogen auf die zu untersuchenden Proben, wurde eine Extraktionsausbeute von ca. 6 % für DMP und ca. 100 % für DMTP zugrunde gelegt und der jeweilige Verdünnungsfaktor bei der Aufarbeitung der Proben berücksichtigt.

Tabelle 23: Auswertung der gaschromatographischen
Messungen

	DMP			DMTP		
	Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)	Peak- fläche (mm ²)	Substanz- menge (ng)	Konz. (mg/l)
Magen- entleerung 30.12.80 14.30 Uhr verseift	288,0	768,0	3840,0	583,0	1495,0	4983,0
Magen- spülung 30.12.80 14.50 Uhr verseift	79,5	212,0	1060,0	369,0	946,0	3153,0
Harn 30.12.80 14.30 Uhr unverseift	48,0	1,30	6,5	272,0	6,9	23,0
Harn 30.12.80 14.30 Uhr verseift	63,0	1,70	8,5	30,0	7,7	25,6
Blut 30.12.80 14.30 Uhr unverseift	98,0	26,0	130,0	1134,0	29,1	97,0
Blut 30.12.80 14.30 Uhr verseift	220,0	59,0	295,0	1040,0	267,0	890,0

3.3. Ergebnis

In allen aufgearbeiteten Proben wurde eindeutig DMP und DMTP in Konzentrationen weit oberhalb der Nachweisgrenze gefunden. Qualitativ entspricht dies dem bei einer Metasystox-Vergiftung erwarteten Ergebnis. Ein Rückschluß auf die ursprünglichen Werte nach fast 3-monatiger Lagerung ist jedoch, wie bereits erwähnt, nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, daß beim langsamen Zerfall des Metasystox und seiner Stoffwechselprodukte immer wieder neues DMP und DMTP entstehen kann.

In Magenentleerung und Magenspülung wurden nach Verseifung große Mengen DMP und DMTP, die Hydrolyseprodukte des Metasystox, gefunden. Die Blutspiegel zeigen nach Verseifung signifikant höhere Werte als vorher. Demnach müßte, wie zu erwarten war, im Blut auch Metasystox enthalten sein, das nach Hydrolyse als DMP und DMTP erscheint. Außerdem findet sich regelmäßig TEP als Ethylierungsprodukt des in Spuren mitextrahierten organischen Phosphates.

Im Harn liegen die Werte erheblich niedriger als im Blut. Doch auch hier wurde nach Verseifung etwas mehr DMP und DMTP gefunden als vorher. Dies deutet darauf hin, daß im Harn eventuell auch das unveränderte Metasystox sowie weitere Metaboliten ausgeschieden werden können. Dies steht im Gegensatz zu der früher verbreiteten Ansicht, im Harn würden nur die Dialkylphosphate als Abbauprodukte ausgeschieden. Neuerdings findet wieder eine Diskussion über dieses Thema statt, gesicherte Ergebnisse lagen aber noch nicht vor. Für unsere Ergebnisse im Fall des Patienten H. konnte keine andere Erklärung als die obengenannte gefunden

werden. Auch die Messung eines Falles von Vergiftung mit einem Insektizid vom Diethylphosphat-Charakter brachte ähnliche Ergebnisse, die diese These unterstützen.

3.4. Dünnschichtchromatographische Kontrollanalyse

Zur teilweisen qualitativen Kontrolle der Ergebnisse wurde auf einen erprobten dünnschichtchromatographischen Nachweis von Dialkylthiophosphaten nach Fischer und Klingelhöller (1961) zurückgegriffen (s.S. 88 ff).

3.4.1. Durchführung und Auswertung

Auf eine Woelm-Kieselgel-Platte 20x20 cm wurden nach 50 min Aktivierung bei 110 °C im Trockenschrank mit einer 10 µl-GC-Spritze folgende Extrakte und Vergleichssubstanzen aufgetragen (Tab. 24):

Tabelle 24: Dünnschichtchromatographische Kontrollanalyse: Liste der aufgetragenen Extrakte und Vergleichssubstanzen

Extrakte:				Auftrags- menge
Magenentleerung	vom 30.12.80	14.30 Uhr	verseift	2 µl 10 µl
Magenspülung	vom 30.12.80	14.50 Uhr	verseift	2 µl 10 µl
Harn	vom 30.12.80	14.30 Uhr	unverseift	2 µl 10 µl
Harn	vom 30.12.80	14.30 Uhr	verseift	2 µl 10 µl
Vergleichssubstanzen:				
DMTP-NH ₄ ⁺	in Methanol	1 mg/ml		2 µl 10 µl
DETP-NH ₄ ⁺	in Methanol	1 mg/ml		10 µl

Die Platte wurde nach Auftrag kurz mit dem Fön getrocknet und im von Fischer und Klingelhöller (1961) angegebenen Laufmittel (s.S. 92) bis zu einer Laufstrecke von ca. 10 cm ca. 30 min lang entwickelt. Nach Trocknen im Abzug wurde sie jedoch nicht mit dem relativ unspezifischen Jodazid-Reagens nach Fischer und Klingelhöller (1961), sondern mit dem von Cook (1954) angegebenen N-Bromsuccinimid-Fluorescein-Sprühareagens zum Nachweis von Thiophosphaten angefärbt. (Zu Zusammensetzung und Anwendung des Reagenzes s.S. 90).

Etwa 2 - 3 min nach Aufsprühen der Reagenzien werden die Thiophosphat-Flecken gelb auf rosa Grund sichtbar.

Die folgende Tabelle zeigt die ausgemessenen R_f -Werte unter den obengenannten Bedingungen (Tab. 25). Die R_f -Werte liegen etwas niedriger als die von Fischer und Klingelhöller (1961) angegebenen Werte, sie konnten jedoch aus den Vergleichssubstanzen zweifelsfrei ermittelt werden.

Tabelle 25: Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Kontrollanalyse:

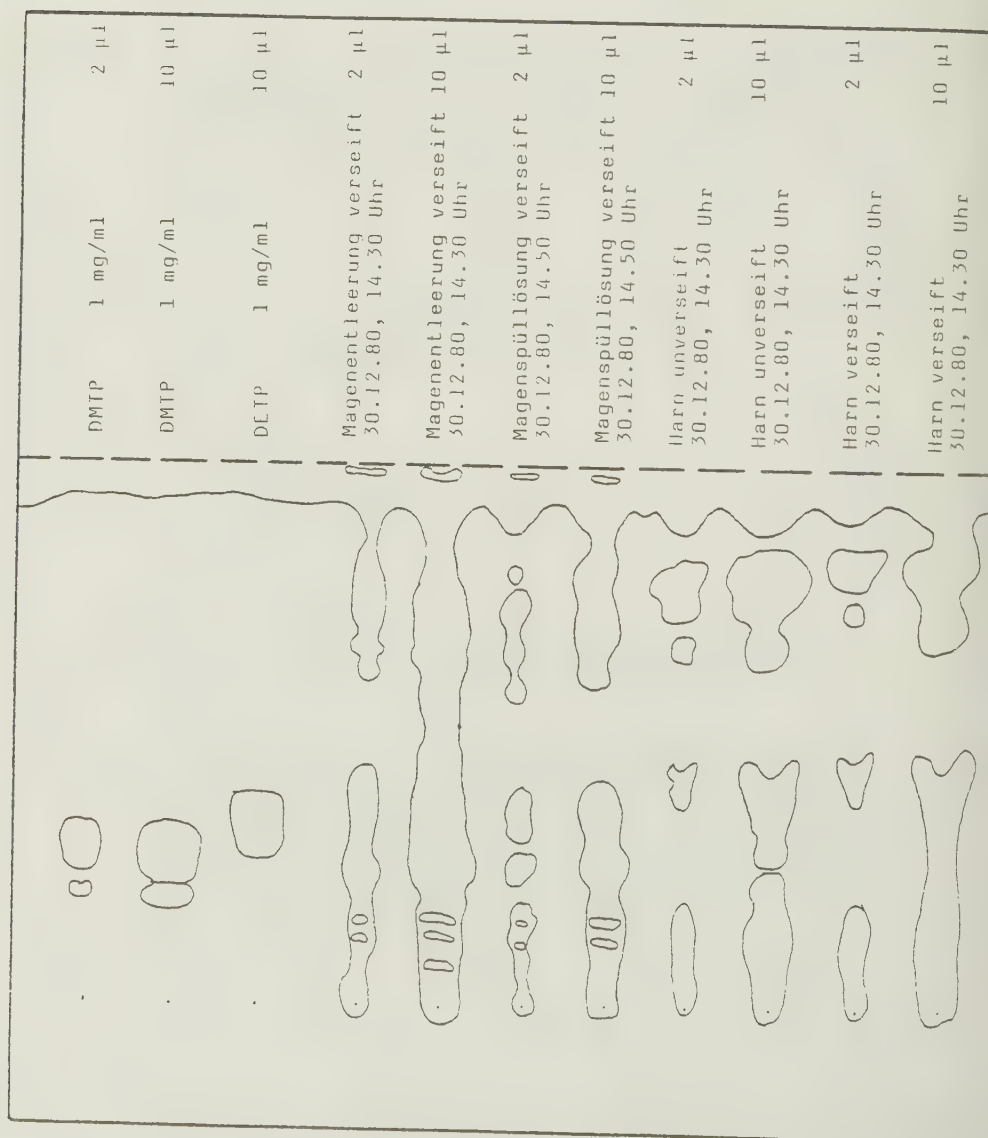
R_f -Werte der Vergleichssubstanzen

	R_f	Anfärbung
DMTP	0,27 - 0,30	nach Besprühen:
DETP	0,33 - 0,36	gelb auf rosa
Warnfarbe:	0,98 - 0,99	vor Besprühen: blau

Die folgende Abbildung (Abb. 53) zeigt eine Durchzeichnung des mit N-Bromsuccinimid-Fluorescein-Sprühreagens angefärbten Chromatogrammes, wobei die gelb auf rosa Grund erscheinenden Flecken umrandet sind.

Ergebnisse der dünnsschichtchromatographischen Kontrollanalyse:

Durchzeichnung des Chromatogrammes (nach Anfärbung)



3.4.2. Ergebnis

Es wurde in allen Fällen DMTP nachgewiesen mit Ausnahme der Proben von unverseiftem und verseiftem Harn vom 30.12.80, 14.30 Uhr mit Auftragsmenge 2 μ l (aufgetragene Substanz unterhalb der Nachweisgrenze). Nach Abschätzung der Fleckengröße fand sich die größte Menge im Extrakt aus verseifter Magenentleerung. Zwischen unverseiftem und verseiftem Harn wurde kein Unterschied deutlich. Dabei ist zu beachten, daß die Entwicklung in einem alkalischen Laufmittel erfolgte und ca. 30 min dauerte. Unter diesen Bedingungen ist eine Verseifung von im Harnextrakt vorhandenem Metasystox auf der Platte nicht auszuschließen. Der blaue Warnfarbstoff, der mit in den Extrakt überging, wurde in den Extrakten aus verseifter Magenentleerung und Magenspülung gefunden und wanderte mit der Laufmittelfront.

Neben diesen identifizierbaren Flecken traten bei der Entwicklung mit N-Bromsuccinimid-Fluorescein eine ganze Reihe weiterer, nicht bekannter Flecken sowie ein allgemein starkes Tailing auf. Im Vergleich zu den gaschromatographischen Messungen erwies sich die Dünnschichtchromatographie als relativ unspezifisch und störanfällig, ganz abgesehen von ihrem begrenzten Anwendungsbereich auf den Nachweis von Dialkylthiophosphaten bei dem von Cook (1954) angegebenen Sprühreagens.

Die Nachweisgrenze bei der Dünnschichtchromatographie läßt sich am vorliegenden Chromatogramm anhand der Vergleichssubstanzen abschätzen und liegt für DMTP in diesem Beispiel bei ca. 0,1 μ g Substanz. Der Nachweis ist also um 2 - 3 Zehnerpotenzen weniger empfindlich als bei der von uns angegebenen gaschromatographischen Methode.

4. Diskussion der Ergebnisse in den Anwendungsbeispielen

Die entwickelte gaschromatographische Methode erwies sich in den klinischen Fallbeispielen als praktisch anwendbar. Die qualitativen Ergebnisse für DMP und DMTP waren eindeutig und können auch im Falle einer nicht eindeutigen Anamnese zusammen mit klinischen Befunden und der Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung die Diagnose

"Alkylphosphat-Intoxikation"

sichern.

Der Verlauf von Blutspiegelkurven und Ausscheidung von Dialkylphosphaten im Harn wären bei unverzögerten Analysen ebenfalls bestimmbar, zumindest im Falle schwerer Vergiftungen. Für die Verfolgung niedriger Blutspiegelwerte oder geringfügiger Ausscheidung, z.B. im Rahmen einer Arbeitsplatzüberwachung, wäre eine Steigerung der Empfindlichkeit der Methode, besonders bezüglich der Extraktionsraten von DMP, notwendig.

Interessant wäre die Klärung der Frage, wie die höheren Werte an Dialkylphosphaten im Harn nach Verseifung der Proben zustande kommen. Es besteht Grund zu der Annahme, daß neben DMP und DMTP wahrscheinlich auch andere Metaboliten, eventuell auch das Grundmolekül (z.B. Metasystox) selbst ausgeschieden werden. Hierzu wären gezielte Untersuchungen an einer Mehrzahl von Fällen erforderlich, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würden.

Da das Problem in neuester Zeit in Fachkreisen wieder diskutiert wird, ist auf neuere Erkenntnisse in dieser Richtung zu hoffen.

F DISKUSSION

Das vorliegende Verfahren ist sicher in einigen Punkten noch zu verbessern. Was kaum Probleme bereitet ist die Qualität der Trennung der in Frage kommenden Substanzen. Wie einige Versuche am Rande zeigten, wäre sogar an die Einbeziehung von Dithiophosphaten in die Trennung zu denken, was eine noch breitere Anwendbarkeit der Methode ermöglichen würde. Dagegen ist die Methode der Extraktion (bes. von DMP), Anreicherung und Derivatisierung für die Gaschromatographie noch verbesserbar. Richtungsweisend sind hier z.B. die Veröffentlichungen von Shafik et al. (1971), Daughton et al. (1976), Blair und Roderick (1976) und Lores und Bradway (1977), die bereits verschiedene Vorreinigungen säulenchromatographischer Art angeben. Darauf wurde bisher verzichtet, um den zeitlichen Aufwand möglichst gering zu halten und die Methode nicht von vornherein unnötig zu komplizieren. Bezüglich der Derivatisierung wären Verbesserungen vor allem zu erwarten, wenn es gelingen würde, ein von Störsubstanzen freies Alkylierungsmittel herzustellen. Dabei wäre eventuell die Herstellung des Reagenzes in einer geschlossenen Destillationsapparatur, wie sie in der organischen Chemie üblich ist, versuchsweise durchzuführen. Bei der Diskussion anderer Derivatisierungsmethoden stellt das vorhandene Trennsäulen- und Detektorsystem eine weitgehende Einschränkung dar.

Die halbquantitative bzw. quantitative Anwendbarkeit der Methode kann in bezug auf die Dialkyl(thio)phosphate positiv beurteilt werden. Probleme gibt es hier noch beim Versuch, nicht metabolisierte Insektizide nach Hydrolyse zu bestimmen. Während die Vorversuche günstig ausfielen und die qualitativen Ergebnisse

eindeutig waren, warf die Anwendung auf klinische Fälle eine Reihe von bisher ungeklärten Fragen auf. Hier könnte nur die gezielte Untersuchung einer größeren Zahl von Fällen mit der Möglichkeit der Kontrolle durch anerkannte Methoden weiterhelfen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Eine Weiterentwicklung und Anwendung des Verfahrens erscheint wünschenswert und aussichtsreich, insbesondere im Hinblick auf ein klinisch-toxikologisches Screening, das die bisherigen analytischen Möglichkeiten bei Alkylphosphat-Intoxikationen ergänzen könnte.

G ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Arbeit war die Ausarbeitung einer Methode zum gaschromatographischen Nachweis von Dimethylphosphat und Dimethylthiophosphat und damit verbunden die gaschromatographische Trennung von DMP, DMTP, DEP und DETP als Abbauprodukte vieler gängiger Insektizide auf Alkylphosphatbasis. Als Fernziel wurde die Entwicklung eines klinischen Screening-Verfahrens für die genannten Verbindungen angestrebt, das die Überwachung von gefährdeten Personen am Arbeitsplatz ebenso wie eine schnelle, sichere Methode zum Nachweis oder Ausschluß von Alkylphosphat-Intoxikationen ermöglichen soll. Es konnte bei der Entwicklung der Methode zum Teil auf frühere Veröffentlichungen, insbesondere von Shafik et al. (1969, 1970, 1971 und 1973) zurückgegriffen werden. Mit dem Ziel, unter Benutzung der zur Verfügung stehenden Geräte ein möglichst einfaches, universell anwendbares und vom Zeitaufwand zumutbares Verfahren zur Untersuchung kleiner Mengen von biologischen Untersuchungsmaterialien zu entwickeln, waren jedoch zahlreiche Modifikationen notwendig.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Verfahren in der vorliegenden Form zwar keinesfalls die bisher üblichen Cholinesterase-Aktivitätsbestimmungen im Serum sowie andere laborchemische und toxikologische Befunde (z.B. p-Nitrophenol-Bestimmung) ersetzen kann. Es stellt aber eine Möglichkeit der qualitativen Analyse bei Verdacht auf chronische oder akute Vergiftung mit Alkylphosphaten dar, wobei eine ganze Reihe von Insektiziden erfaßt werden, die bisher nur mit Spezialmethoden nachgewiesen werden konnten. Dabei arbeitet es mit Nachweisgrenzen in der Größenordnung von 0,1 - 0,5 ng Substanz bei der gaschromatographischen Messung, was zu einer praktischen Nachweisgrenze von 0,01 µg/ml (0,15 µg/ml für DMP) der Substanzen im zu untersuchenden biologischen Ausgangsmaterial führt, bei Ausschöpfung aller Möglichkeiten eventuell noch darunter, und ist bisher auf alle Arten von biologischem Untersuchungsmaterial anwendbar.

H BIBLIOGRAPHIE

1. Aldrich Chemical Co.:
Diazomethane generators.
Technical Information Bulletin No. AL - 103
2. Askew, J., Ruzicka, J.H. and Weals, B.B.:
Organophosphorus pesticides.
A gas chromatographic screening technique based on
the detection of methylated hydrolysis products.
J. Chromatog. 41, 180 (1969)
3. Blair, D. and Roderick, H.R.:
An improved method for the determination of urinary
dimethyl phosphate.
J. Agric. Food Chem. 24, 1221 (1976)
4. Blau, K. and King, G.S.:
Handbook of derivatives for chromatography.
Heyden & Son Ltd., London (1978)
5. Bloom, P.J.:
Application des chromatographies sur couche
mince et gaz-liquide à l'analyse qualitative
et quantitative des esters des acides phosphorique
et phosphoreux.
J. Chromatog. 75, 261 (1973)
6. Claus, G. und Ebner, H.:
Grundlagen der Statistik.
Verlag Harri Deutsch, Zürich und Frankfurt am Main 1975

7. Comer, S.W., Ruark, H.E. and Robbins, A.L.:
Stability of parathion metabolites in urine
samples collected from poisoned individuals.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16, 618 (1976)
8. Cook, J.W.:
Paper chromatography of some organic phosphate
insecticides.
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 37, 984 (1954)
9. Daughton, C.G., Crosby, D.G., Garnas, R.L. and
Hsieh, D.P.:
Analysis of phosphorus-containing hydrolytic
products of organophosphorus insecticides in
water.
J. Agric. Food Chem. 24, 236 (1976)
10. Davis, J.E., Cranmer, M.F. and Peoples, A.J.:
Gas-liquid chromatography of parathion metabolites
as a sensitive index of induction of liver micro-
somal mixed-function oxidases.
Anal. Biochem. 53, 522 (1973)
11. Drozdz, J.:
Chemical derivatisation in gas chromatography.
J. Chromatog. 113, 303 (1975)
12. Eben, A. und Geldmacher - von Mallinckrodt, M.:
p-Nitrophenol
Bestimmung im Harn.
In: Henschler, D. (Hrsg.):
Analysen in biologischem Material
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1978)

13. Fischer, W.:
Persönliche Mitteilung (1980)
14. Fischer, R. und Otterbeck, N.:
Zum Nachweis von Thiophosphorsäureestern.
Sci. Pharm. 27, 1 (1959)
15. Fischer, R. und Klingelhöller, W.:
Der Nachweis und die quantitative Bestimmung
von Thiophosphorsäureestern in biologischem
Material.
Arch. Toxikol. 19, 119 (1961)
16. Fischer, R. und Plunger, Chr.:
Nachweis und quantitative Bestimmung von Phosphor-
insekticiden im biologischen Material.
Arch. Toxikol. 21, 101 (1965)
17. Geldmacher - von Mallinckrodt, M.:
Über den Nachweis insectizider Ester der Dialkyl-
thio- und Dithiophosphorsäuren mit β -Oxyäthyl-
thioäthyläther für forensische Zwecke.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg,
Inst. f. gerichtliche Medizin und Kriminalistik
(1964)
18. Geldmacher - von Mallinckrodt, M.:
Klinisch-toxikologische Analytik
- Lage und Ausbaunotwendigkeit -
Vortrag auf der Jahresversammlung der DFG in
Karlsruhe vom 22. bis 24. Juni 1981

19. Graf, E. (Hrsg.):
Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie
und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte.
Band II: Allgemeine Methoden
Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1966)
20. Griest, W.H. and Martin, I.W.:
Stimulated sequential dehydroxy-fluorination:
A safe, convenient method for gas-chromatographic
analysis of phosphate diesters with possible
application to hydrolysates of organophosphorus
pesticides and nerve gases.
J. Chromatog. 192, 173 (1980)
21. Hardy, C.J.:
Analysis of alkyl esters of phosphoric acid by
gas chromatography.
J. Chromatog. 13, 372 (1964)
22. Jaglan, P.S., March, R.B., Fukuto, I.R. and
Gunther, F.A.:
Gas-liquid chromatographic determination of
methyl parathion and metabolites.
J. Agr. Food Chem. 18, 809 (1970)
23. Lamotte, A. et Merlin, J.-C.:
Chromatographie sur couches minces de quelques
composes organiques du phosphore.
J. Chromatog. 38, 296 (1968)
24. Lores, E.M. and Bradway, D.E.:
Extraction and recovery of organophosphorus
metabolites from urine using an anion exchange
resin.
J. Agric. Food Chem. 25, 75 (1977)

25. Moeschlin, S.:
Klinik und Therapie der Vergiftungen.
6. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1980)
26. Müller, B.:
Gerichtliche Medizin.
2. Auflage
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1975)
27. Müller, R.:
Diethylphosphat und Diethylthiophosphat -
Gaschromatische Trennung und Nachweis im Urin
bei Alkylphosphatvergiftungen.
Dissertation, Erlangen (1983)
28. Paulus, H.:
Gas-chromatographische Bestimmung von Blut-
spiegelkurven malariawirksamer Aminochoinine.
Dissertation, Erlangen (1972)
29. Perkow, W.:
Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlings-
bekämpfungsmittel.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg (1979)
30. Prokop, O. und Göhler, W.:
Forensische Medizin.
3. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1976)
31. Richards, D.M., Kraus, J.F., Kurtz, P., Borhani, N.O.,
Mull, R., Winterlin, W. and Kilgore, W.W.:
A controlled field trial of physiological responses
to organophosphorus residues in farm workers.
J. Environ. Path. Toxicol. 2, 493 (1979)

32. Riemer, F., Rüter, Ch., Berling, R. und Grisk, A.:
Nachweis von Organophosphatmetaboliten im Urin
mittels Gaschromatographie.
Akute Intoxikationen - Prophylaxe, Analytik,
Diagnose, Therapie -, 3. Symposium, Reinhardsbrunn
(Thüringen, DDR), 12. - 14.4.1978
S. 307, Leipzig (1978)
33. Shafik, M.I. and Enos, H.F.:
Determination of metabolic and hydrolytic products
of organophosphorus pesticide chemicals in human
blood and urine.
J. Agr. Food Chem. 17, 1186 (1969)
34. Shafik, M.I., Bradway, D., Biros, F.J. and Enos, H.F.:
Characterization of alkylation products of diethyl
phosphorothioate.
J. Agr. Food Chem. 18, 1174 (1970)
35. Shafik, M.I., Bradway, D. and Enos, H.F.:
A cleanup procedure for the determination of low
levels of alkyl phosphates, thiophosphates and
dithiophosphates in rat and human urine.
J. Agr. Food Chem. 19, 885 (1971)
36. Shafik, M.I., Bradway, D., Enos, H.F. and Yobs, A.R.:
Human exposure to organophosphorus pesticides.
A modified procedure for the gas-liquid chromato-
graphic analysis of alkyl phosphate metabolites
in urine.
J. Agr. Food Chem. 21, 625 (1973)
37. Schrader, G.:
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester.
3. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1963)

38. Soergel, F.:
Persönliche Mitteilung (1981)
39. Ullmanns
Encyklopädie der technischen Chemie
Band 13, Band 18, 4. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1979)

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling meinen Dank auszusprechen für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, insbesondere aber für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Besonders herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher - von Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und ihre bereitwillige Beratung und Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Bei dem Personal der Toxikologischen Abteilung des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Erlangen - Nürnberg möchte ich mich für die allzeit gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schütz für die freundliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Max v. Clarmann danke ich herzlich für die Bereitstellung der von mir untersuchten Asservate.

Der Fa. Bayer danke ich für die bereitwillige Beschaffung nicht im Handel erhältlichlicher Chemikalien.

LEBENS LAUF

Personalien:

Heinrich Richard Hindelang
geb. am 12.4.1956 in Neumarkt/Opf.
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Eltern: Heinrich Ludwig Hindelang, Prokurist
Johanna Hindelang, geb. Müller

Ausbildung:

1962 - 1966	Evangelische Volksschule in Neumarkt
1966 - 1975	Ostendorfer - Gymnasium in Neumarkt
1975	Abitur am Ostendorfer - Gymnasium in Neumarkt
WS 1975/1976	IU München: Studienfach HLB Chemie/Informatik
1.4.76 - 30.6.77	Wehrdienst
WS 1977/78	Immatrikulation an der Friedrich - Alexander - Universität Erlangen - Nürnberg
1978	Studienfach: Zahnmedizin Naturwissenschaftliche Vorprüfung in Erlangen
1980	Zahnärztliche Vorprüfung in Erlangen
1982	Staatsexamen in Erlangen
20.1.1983	Bestallung als Zahnarzt

